



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Estudio de los mecanismos de resistencia a linezolid en  
Staphylococcus y Enterococcus.

Autor/es

PAULA EGUIZÁBAL MARCOS

Director/es

MIRIAM ZARAZAGA CHAMORRO y CARMEN TORRES MANRIQUE

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Química

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2019-20



***Estudio de los mecanismos de resistencia a linezolid en Staphylococcus y Enterococcus.***, de PAULA EGUIZÁBAL MARCOS

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor, 2020

© Universidad de La Rioja, 2020

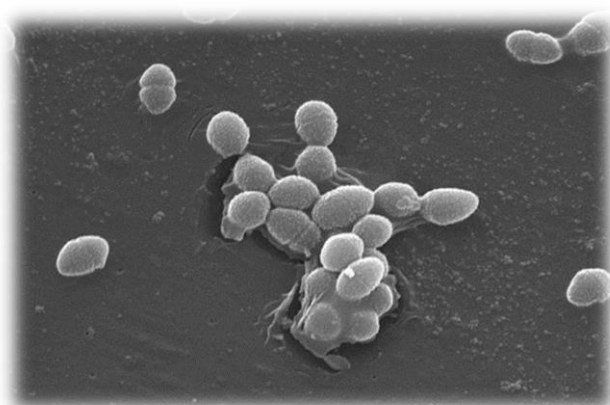
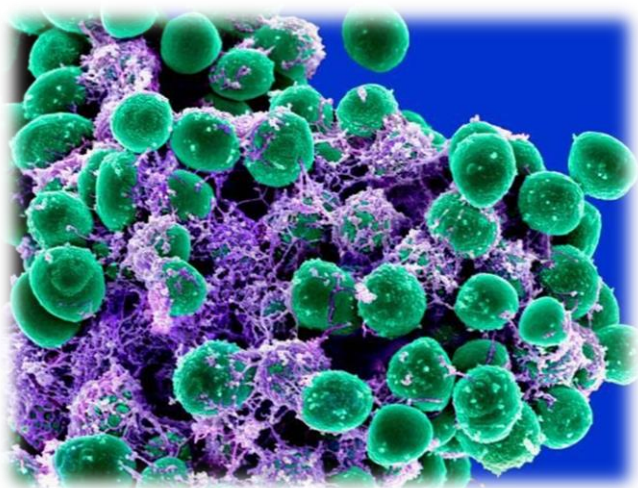
[publicaciones.unirioja.es](http://publicaciones.unirioja.es)

E-mail: [publicaciones@unirioja.es](mailto:publicaciones@unirioja.es)

# Estudio de los mecanismos de resistencia a linezolid en *Staphylococcus* y *Enterococcus*.

Tutoras: Carmen Torres Manrique

Myriam Zarazaga Chamorro



**PAULA EGUIZÁBAL MARCOS**

TRABAJO FIN DE GRADO

Curso 2019/2020

## RESUMEN

Uno de los problemas sanitarios más importantes actualmente a nivel mundial es la resistencia bacteriana a los antibióticos y su diseminación, tanto en el ámbito clínico como agroalimentario o veterinario. En este trabajo se ha llevado a cabo la caracterización genética de los mecanismos de resistencia a antibióticos de 18 cepas clínicas de *Staphylococcus* spp (n=15) y *Enterococcus* spp (n=3), resistentes a linezolid (LZD<sup>R</sup>), procedentes del Hospital San Pedro (HSP, Logroño) y del Hospital Arnau-Vilanova (HAV, Lérida). Dichos hospitales aportaron los datos de los fenotipos de resistencia a antibióticos de las cepas, que fueron complementados en este TFG mediante la técnica de difusión en disco (CLSI, 2019).

Las 18 cepas del estudio (13 *S. epidermidis*, 1 *S. aureus*, 1 *S. hominis* y 3 *E. faecalis*) presentaron un fenotipo de multirresistencia (resistencia a al menos tres familias de antibióticos). Se obtuvo su ADN y se analizó por PCR (seguida en algunos casos por secuenciación) un total de 10 genes que confieren resistencia a: linezolid (*cfr*, *optrA*, *poxA*, *cfrB*), beta-lactámicos (*mecA*, *blaZ*), macrólidos-clindamicina (*ermA*, *ermB*, *ermC*), y aminoglucósidos (*ant(4')*-la). Se estudiaron otros mecanismos de resistencia a LZD: las mutaciones en los genes codificantes del ARNr 23S o de las proteínas ribosomales L3, L4 y L22; para ello se procedió a la amplificación por PCR de dichos genes y a su posterior secuenciación y análisis para detectar posibles mutaciones y los cambios en aminoácidos deducidos.

Todas las cepas de *Staphylococcus* contenían los genes *blaZ*, *mecA* y *ant(4')*-la y 4 de ellas el gen *ermC*. En cuanto a los mecanismos de resistencia a LZD: dos cepas portaban el gen de multirresistencia *cfr* (*S. aureus* y *S. epidermidis*), y todas fueron negativas para *optrA*, *poxA* y *cfrB*. Dicho gen codifica una ARNr metiltransferasa. Por otro lado, se detectó la mutación G2603T en el gen del ARNr 23S, en 11 cepas *S. epidermidis* y en la cepa *S. hominis*, todas ellas con una concentración mínima inhibitoria a LZD de >256 µg/mL. Por otra parte, en la proteína ribosomal L3 se han detectado los cambios aminoacídicos Q136L acompañado de M156T en once cepas de *S. epidermidis*, y A157R con M156T en una cepa adicional de *S. epidermidis*. En la proteína L4 se ha detectado la inserción de una glicina in-71Gly72 en 11 cepas de *S. epidermidis*, y el cambio G69R en 6 de ellas acompañando a la inserción. Las 3 cepas de *Enterococcus* LZD<sup>R</sup> contenían el gen de resistencia *optrA*, descrito por primera vez en 2015 en China y que es responsable de la resistencia a dicho antibiótico; codifica una proteína ATP-binding cassette F.

Este estudio demuestra que hay diferentes mecanismos de resistencia circulantes entre las cepas de estafilococos y enterococos estudiadas, tanto relacionados con mutaciones en las dianas de acción del antibiótico, sin capacidad de transferencia horizontal, como mecanismos mediados por genes que confieren resistencia cruzada con otros antibióticos potencialmente movilizables y transferibles (*cfr* y *optrA*), lo que se traduce en mayor problemática epidemiológica.

## ABSTRACT

Currently, one of the most important microbiological problems worldwide is bacterial resistance to antibiotics and their spread, either in the clinical, food or veterinary fields. In this work, the genetic characterization of the antibiotic resistance mechanisms of 18 clinical linezolid-resistant (LZD<sup>R</sup>) strains of *Staphylococcus* spp. (n = 15) and *Enterococcus* spp. (n = 3), from the Hospital San Pedro (HSP, Logroño) and the Hospital Arnau-Vilanova (HAV, Lérida). These hospitals provided data on the antibiotic resistance phenotypes of these strains, which were complemented in this TFG using the disk diffusion technique (CLSI, 2019).

The 18 strains included in this study (13 *S. epidermidis*, 1 *S. aureus*, 1 *S. hominis* and 3 *E. faecalis*) presented a multi-resistance phenotype (resistance to at least three families of antibiotics). DNA was obtained from the 18 strains and a total of 10 antibiotic resistance genes conferring resistance to: linezolid (*cfr*, *optrA*, *poxA*, *cfrB*), beta-lactams were analyzed by PCR (followed in some cases by sequencing) (*mecA*, *blaZ*), macrolides-clindamycin (*ermA*, *ermB*, *ermC*), aminoglycosides (*ant(4')-Ia*). Also, other resistance mechanisms LZD were studied, such as mutations in the genes encoding 23S rRNA or ribosomal proteins L3, L4 and L22; these genes were amplified by PCR and subsequently sequenced and analyzed to detect possible mutations and changes in deduced amino acid sequences.

In the case of the *Staphylococcus* strains, all the strains contained *blaZ*, *mecA* and *ant(4')-Ia* genes and 4 of them the *ermC* gene. Regarding the mechanisms of resistance to LZD: two strains carried the multiresistance *cfr* gene (*S. aureus* and *S. epidermidis*), and all were negative for *optrA*, *poxA* and *cfrB*. This gene encodes a rRNA methyltransferase. On the other hand, the G2603T mutation was detected in the 23S rRNA gene in 11 *S. epidermidis* strains and in the *S. hominis* strain, which showed a minimum inhibitory concentration (MIC) to LZD of >256 µg/mL. On the other hand, the amino acid change Q136L accompanied by M156T were detected in the L3 ribosomal protein in eleven *S. epidermidis* strains, and A157R with M156T in an additional *S. epidermidis* isolate. In the L4 protein, the insertion of an in-71Gly72 glycine was detected in 11 *S. epidermidis* strains, and the G69R change in 6 of them accompanying the insertion.

The three *Enterococcus* LZD<sup>R</sup> strains contained the emerging resistance gene *optrA*, described in 2015 in China and responsible for resistance to this antibiotic; encodes an ATP-binding cassette F protein.

This study demonstrates that there are different resistance mechanisms circulating between the *Staphylococcus* spp and *Enterococcus* spp strains studied, both mediated by potentially mobilizable genes (*cfr* and *optrA*), and related to mutations in the antibiotic action targets, and therefore without horizontal transfer capacity between bacteria.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>III</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>V</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 EL GÉNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> .....	1
1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	1
1.1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	2
1.1.3 <i>Staphylococcus hominis</i> .....	2
1.2 EL GÉNERO <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	2
1.2.1 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	3
1.3 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS. ELEMENTOS GENÉTICOS DE ADQUISICIÓN Y DISEMINACIÓN. ....	3
1.4 LINEZOLID.....	5
1.4.1 Estructura y mecanismo de acción del linezolid.....	6
1.4.2 Mecanismos de resistencia a linezolid .....	7
1.5 EPIDEMIOLOGÍA DE LA RESISTENCIA A LINEZOLID EN <i>ENTEROCOCCUS</i> Y <i>STAPHYLOCOCCUS</i> .....	9
1.5.1 Resistencia a linezolid en <i>Enterococcus</i> .....	9
1.5.2 Resistencia a linezolid en <i>Staphylococcus</i> .....	10
1.6 OTROS ANTIBIÓTICOS .....	12
1.6.1 $\beta$ -lactámicos.....	12
1.6.2 Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas (MLS).....	13
1.6.3 Tetraciclinas .....	14
1.6.4 Aminoglucósidos .....	15
1.6.5 Fenicoles.....	15
1.6.6 Mupirocina.....	16
1.6.7 Glucopéptidos .....	16
1.6.8 Fusidanos.....	17
1.6.9 Diaminopirimidinas .....	17

1.6.10	Quinolonas .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS DEL TRABAJO.....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
3.1	AISLAMIENTO DE LAS CEPAS .....	20
3.2	DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS .....	23
3.3	EXTRACCIÓN DE ADN DE LAS CEPAS.....	24
3.3.1	Extracción de ADN en <i>Staphylococcus</i> .....	24
3.3.2	Extracción de ADN en <i>Enterococcus</i> .....	25
3.4	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	25
3.5	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA .....	29
3.6	SECUENCIACIÓN DEL ADN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS .....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>32</b>
4.1	ESTUDIO EN <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP .....	32
4.2	ESTUDIO DE LAS CEPAS DE <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	38
<b>5</b>	<b>CONTINUACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estructura y nomenclatura de los anillos  $\beta$ -lactámicos.

Tabla 2. Características de las 18 cepas resistentes a linezolid incluidas en este estudio.

Tabla 3. Carga del disco antibiótico empleados y los halos de inhibición para el estudio de *Staphylococcus* y *Enterococcus*.

Tabla 4. Reactivos usados en una reacción de PCR para un volumen de 50  $\mu$ L.

Tabla 5. Secuencias y condiciones de amplificación de los genes.

Tabla 6. Secuencia de GenBank para las secuencias de referencia.

Tabla 7. Fenotipo y genotipo de resistencia de 15 cepas del género *Staphylococcus* incluidas en este estudio.

Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a linezolid y mecanismos de resistencia implicados de las 15 cepas del género *Staphylococcus* incluidas en este estudio.

Tabla 9. Fenotipo y genotipo de resistencia de las 3 cepas del género *Enterococcus* incluidas en este estudio.

Tabla 10. CMI a linezolid y mecanismos de resistencia implicados de las 3 cepas del género *Enterococcus* incluidas en este estudio.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. *Staphylococcus aureus*.
- Figura 2. *Staphylococcus epidermidis*.
- Figura 3. *Staphylococcus hominis*.
- Figura 4. *Enterococcus faecalis*.
- Figura 5. Porcentaje de aislados de *Staphylococcus aureus* con resistencia a la meticilina, por país europeo.
- Figura 6. Transferencia horizontal de genes en las bacterias.
- Figura 7. Estructura del linezolid
- Figura 8. Sitio de unión del linezolid e interacción con nucleótidos cercanos.
- Figura 9. Estructura de la eritromicina (macrólido) y clindamicina (lincosamida)
- Figura 10. Estructuras de dalfopristina y quinustristina (estreptograminas)
- Figura 11. Estructura de la tetraciclina
- Figura 12. Estructura de la tobramicina.
- Figura 13. Estructura del cloranfenicol.
- Figura 14. Estructura de la mupirocina.
- Figura 15. Estructura de la vancomicina.
- Figura 16. Estructura del ácido fusídico.
- Figura 17. Estructura del trimetoprim.
- Figura 18. Estructura del ciprofloxacino.
- Figura 19. Número de cepas de cada especie estudiadas.
- Figura 20. Siembra por agotamiento por estría.
- Figura 21. Siembra en extensión de distintos microorganismos.
- Figura 22. Antibiograma
- Figura 23. Ejemplo de cromatograma obtenido tras la secuenciación.
- Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa del gen *cfr*.
- Figura 25. Mutaciones en ARNr 23S de la cepa X2220.
- Figura 26. Cromatograma de la cepa X2221.
- Figura 27. Mutaciones en la proteína L4 de la cepa X2314.
- Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa del gen *optrA*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABC-F	Proteínas dependientes de ATP sin dominio transmembrana
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMC	Amoxicilina/Ácido clavulánico
AMP	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
BHI	Brain Heart Infusion
°C	Grado centígrado
CC. AA.	Comunidades autónomas
CHL	Cloranfenicol
CIP	Ciprofloxacino
CLI	Clindamicina
CLSI	Clinical and Laboratory Standar Institute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
dNTPs	Desoxinucleotidos trifosfato
EGM	Elementos genéticos móviles
ERI	Eritromicina
EUCAST	European Comitee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and Drug Administration
FE-G	Factor de elongación G
FOS	Fosfomicina
FOX	Cefoxitina

GEN	Gentamicina
HAV	Hospital Arnau-Vilanova
HSP	Hospital San Pedro
LEV	Levofloxacino
LZD	Linezolid
LZD <sup>R</sup>	Resistente a linezolid
min	Minuto
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MLST	Multilocus Sequence Typing
mM	milimolar
MUP	Mupirocina
OXA	Oxacilina
pb	Pares de bases
PBPs	Penicillin binding protein (Proteínas de unión a la penicilina)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PEN	Penicilina
pH	Potencial de hidrógeno
PRI	Pristinamicina
PTC	Centro de peptidil transferasa
Q/D	Quinupristin/Dalfopristin
RIF	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina
SCoN	<i>Stapylococcus</i> coagulasa negativo
SCoP	<i>Stapylococcus</i> coagulasa positivo

SERM	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistentes a meticilina
spp	Especie
STR	Estreptomicina
SXT	Trimetoprim-Sulfametoxazol
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Ácido bórico/EDTA
TEC	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
TFG	Trabajo fin de grado
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UFC	Unidades formadoras de colonias
UR	Universidad de La Rioja
μL	Microlitros

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 El género *Staphylococcus*

*Staphylococcus* es un género de bacterias que pertenecen a la clase *Bacilli*. Son microorganismos presentes en la mucosa y piel de humanos y de animales sanos, especialmente en mamíferos y aves. Este género comprende un total de 51 especies, 17 de las cuales es posible aislarlas en el ser humano. Son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, además tienen un perfil mesófilo y son halotolerantes. Este género se puede dividir en dos grupos, *Staphylococcus* coagulasa positivo (SCoP) como *S. aureus*, *S. pseudintermedius* o *S. intermedius*; y *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCoN) como *S. epidermidis*, *S. hominis* o *S. saprophyticus*, entre otros. Esta característica viene determinada por la presencia o ausencia de la enzima coagulasa, encargada del paso de fibrinógeno a fibrina, lo que provoca la coagulación de la sangre. Dentro de los estafilococos, existen especies con baja o nula patogenicidad, mientras que otras pueden causar graves enfermedades.

### 1.1.1 *Staphylococcus aureus*

Esta especie fue identificada por el cirujano Alexander Ogston en 1880, de un exudado purulento. Se considera la especie más virulenta del género *Staphylococcus*. No posee flagelos ni esporas, aunque posee una cápsula que es capaz de producir un pigmento de color amarillo dorado que descompone el manitol. Se encuentra en la microbiota del ser humano, habitualmente en la mucosa nasal (Lozano et al., 2011). Con frecuencia *S. aureus* se encuentra en simbiosis con el ser humano, sin causar enfermedad, pero también es considerado un importante patógeno oportunista del hombre, debido al gran número de infecciones que es capaz de producir (Foster et al., 2009, van Belkum et al., 2009). *S. aureus* puede causar tanto infecciones leves de piel y mucosas como infecciones de mayor gravedad como neumonía, meningitis o endocarditis, entre otras. También puede causar intoxicaciones alimentarias debido a la ingestión de toxinas producidas por esta bacteria cuando está presente en los alimentos.



Figura 1. *Staphylococcus aureus*. (Fuente: Janice Haney Carr 2001)

### 1.1.2 Staphylococcus epidermidis

*S. epidermidis* es la especie SCoN más abundante en la piel del ser humano, donde actúa como comensal, pero también puede ser causante de infecciones como patógeno oportunista, que con frecuencia son de tipo crónico. Las infecciones causadas por *S. epidermidis* normalmente son nosocomiales, es decir, son contraídas por pacientes ingresados en el hospital, especialmente aquellos inmunocomprometidos. Este microorganismo está muy relacionado con la formación de biofilms, aglomeraciones bacterianas unidas a una superficie (Otto, 2014).



Figura 2. *Staphylococcus epidermidis* (Fuente: Microbiologics Blog, 2016)

### 1.1.3 Staphylococcus hominis

Entre las especies incluidas en el grupo de SCoN, *S. hominis*, es relativamente abundante, y se ha detectado como agente causal de endocarditis y bacteriemia, en general en infecciones nosocomiales. Igual que ocurría con *S. epidermidis*, también posee la capacidad de formar biofilms. *S. hominis* se detecta con más frecuencia en pacientes de Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), con otras patologías graves (Frickmann et al., 2018).

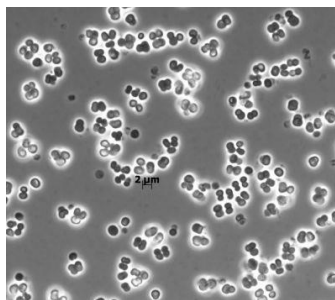


Figura 3. *Staphylococcus hominis*. (Fuente: Leibniz-Institut DSMZ).

## 1.2 El género *Enterococcus*

*Enterococcus* es un género bacteriano que pertenece a la familia *Enterococcaceae*. Son cocos Gram-positivos que suelen presentarse en parejas o en cadenas. Además, son microorganismos

anaerobios facultativos. Los enterococos han sido clasificados como estreptococos del grupo D hasta el año 1984, cuando recibieron el nombre de *Enterococcus*. Estos microorganismos podemos encontrarlos en el sistema gastrointestinal tanto humano como animal, en alimentos fermentados y productos lácteos, y así como en diversos medios como agua, suelo e incluso las plantas. Esto es debido a sus propiedades, ya que pueden sobrevivir en un amplio rango de pH y de temperaturas, además de soportar condiciones hipotónicas e hipertónicas (Gilmore et al., 2014). Hay dos especies que se encuentran frecuentemente como comensales en el intestino humano, *E. faecalis* y *E. faecium*.

### 1.2.1 *Enterococcus faecalis*

La especie *E. faecalis* fue descubierta en 1899 por MacCallum y Hastings, a partir de un caso de endocarditis (MacCallum & Hastings, 1899). Este microorganismo era capaz de coagular la leche, así como de fermentar el manitol o la lactosa, pero no la rafinosa. Se le conoce con el nombre de *faecalis*, ya que era característico del intestino humano y era eliminado en las heces. Hasta mediados de la década de 1990, *E. faecalis* era el enterococo más aislado clínicamente, entre un 90-95% de los casos. Pero a partir de entonces, los aislamientos de *E. faecium* han ido aumentando debido a la resistencia a antibióticos como vancomicina o ampicilina, en contraposición de los aislamientos de *E. faecalis*. Es capaz de sintetizar enzimas que contribuyen a la formación de biopelículas, facilitando su defensa contra la respuesta del huésped y su supervivencia (Hall-Stoodley et al., 2009).

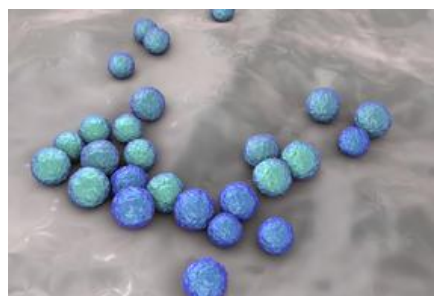


Figura 4. *Enterococcus faecalis* (Fuente: Science Source)

## 1.3 Resistencia a los antibióticos. Elementos genéticos de adquisición y diseminación.

La resistencia a los antibióticos es considerada un problema de salud a nivel mundial. Se ha demostrado que un uso indebido de antibióticos es una de las principales causas del desarrollo de resistencias bacterianas, y existe una clara correlación entre el uso de antibióticos y la emergencia de bacterias resistentes a los mismos. Así, países con un elevado uso de antibióticos, como puede

ser Francia o España, también muestran una elevada tasa de resistencia; y al contrario, países como Dinamarca o Países Bajos con un uso reducido de antibióticos presentan una baja resistencia (European Centre for Disease Prevention and Control, 2018).

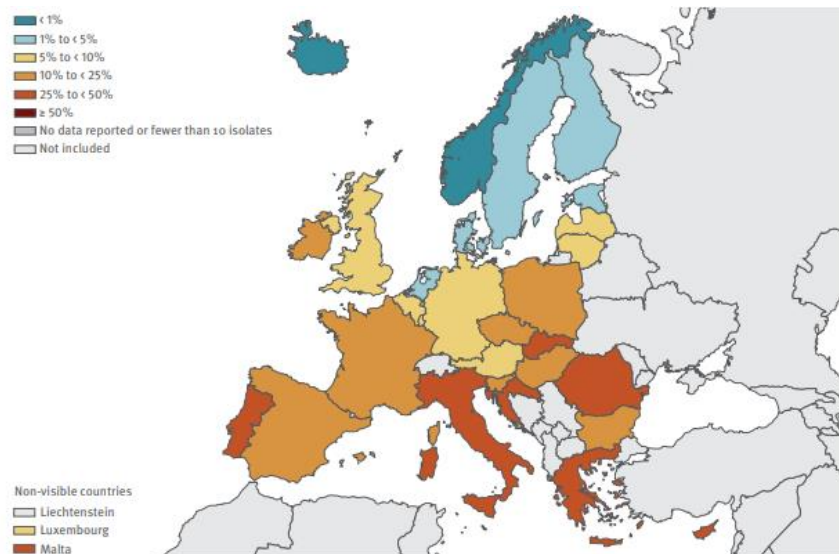


Figura 5. Porcentaje de aislados de *Staphylococcus aureus* con resistencia a la meticilina, por país europeo (Fuente: Surveillance of antimicrobial resistance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2018)

La resistencia a los antibióticos puede ser intrínseca o adquirida (Mulvey et al., 2009):

- **Intrínseca:** Esta resistencia la poseen de forma natural un determinado grupo, género o especie bacteriana, en ausencia de mecanismos de presión de selección antimicrobiana y suelen ser de localización cromosómica.
- **Adquirida:** Aparece solamente en algunas cepas de una especie normalmente sensible y es causa del fracaso terapéutico. Este tipo de resistencia puede ser por mutación en genes propios de la bacteria o por la adquisición de otros genes que confieren una resistencia y que no se tuviese anteriormente.

Los elementos genéticos móviles (EGM) permiten la adquisición y diseminación de genes que confieren resistencia como pueden ser:

- **Plásmidos:** Son moléculas de ADN cíclicas de doble cadena, con la capacidad de replicarse automáticamente que, por lo general, no poseen genes esenciales sino genes que aportan ventajas adaptativas a la bacteria, como la resistencia a antibióticos.
- **Transposones y Secuencias de inserción:** Son secuencias de ADN, con un tamaño más pequeño que los plásmidos, capaces de moverse dentro de la propia molécula de ADN o incorporarse al ADN de otra bacteria. Este movimiento puede darse entre dos plásmidos o entre plásmido y cromosoma.



- **Integrones:** Son fragmentos genéticos que poseen la capacidad de captar genes, denominados genes cassette (aquellos que contienen un gen y un lugar de recombinación genética).

El mecanismo mayoritario para la adquisición de nuevos genes de resistencia es la transferencia horizontal, que se produce entre bacterias procedentes de un mismo entorno. Puede ocurrir entre bacterias del mismo género o entre bacterias distintas que no sean descendiente unas de otras.

- Conjugación: Es la transmisión de plásmidos y transposones entre bacterias, por medio de los pili sexuales.
- Transformación: Consiste en la introducción, adsorción y expresión del ADN o ARN del entorno. Posteriormente pueden liberarse como consecuencia de la lisis bacteriana.
- Transducción: Es la transferencia de ADN exógeno mediante un bacteriófago (un virus bacteriano) a una bacteria receptora.

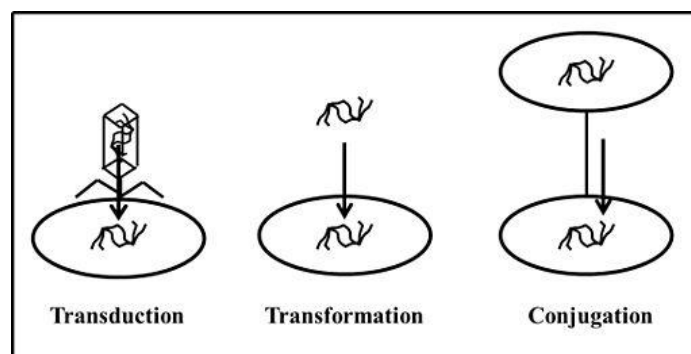


Figura 6. Transferencia horizontal de genes en las bacterias (Fuente: 2013MMG320B [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)] vía Wikimedia Commons)

#### 1.4 Linezolid

El linezolid es el antimicrobiano característico del grupo de las oxazolidinonas. En 1978 se introdujeron compuestos de este grupo para el control de enfermedades en plantas, pero fue en el año 2000 cuando la Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos aprobó el uso del linezolid en clínica humana, y a partir de entonces ha sido un antibiótico clave en el tratamiento de las infecciones por bacterias Gram positivas multirresistentes (Tyson et al., 2018).

El linezolid es un antibiótico sintético que inhibe la síntesis proteica mediante su unión a las unidades ribosómicas 50S. Se inhibe la formación de complejos de iniciación que reducen la

longitud de las cadenas peptídicas y disminuye la velocidad de reacción de traducción (Livermore, 2003).

Linezolid se usa para el tratamiento de infecciones graves por *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Staphylococcus epidermidis* resistente a meticilina (SERM) o *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, entre otras bacterias multirresistentes.

#### 1.4.1 Estructura y mecanismo de acción del linezolid.

La estructura tiene mucho que ver en la actividad del linezolid. La configuración S del carbono quiral y el grupo N-arilo son esenciales en la actividad de las oxazolidinonas. Además, el fluoruro del anillo aromático, es un grupo aceptor de electrones, lo que favorece aún más la actividad de este tipo de moléculas. La existencia de sustituyentes en la estructura no afecta en la actividad de la molécula, pero puede afectar a la solubilidad y a la farmacocinética (Hashemian et al., 2018).

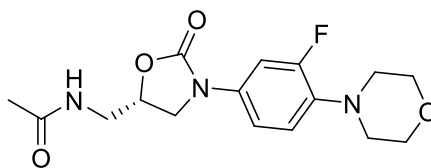


Figura 7. Estructura del linezolid (Elaboración propia)

En 1999 se encontraron las primeras indicaciones del sitio de unión del linezolid en el ribosoma, a partir de estudios de mutaciones que conferían resistencia en el ARNr 23S. Se encontró que el centro de peptidil transferasa (PTC) se colocaba en la subunidad ribosomal 50S, en la parte inferior de la hendidura donde se colocan el extremo 3'-aminoacil-ARNt y peptidil-ARNt para la transferencia de péptidos (Long & Vester, 2012). En 2008, se confirmó el sitio de unión, gracias al análisis de estructuras cristalinas. Estas estructuras revelan como el linezolid se une al sitio A del PTC, y es capaz de interactuar con los nucleótidos del ARNr 23S cercanos.

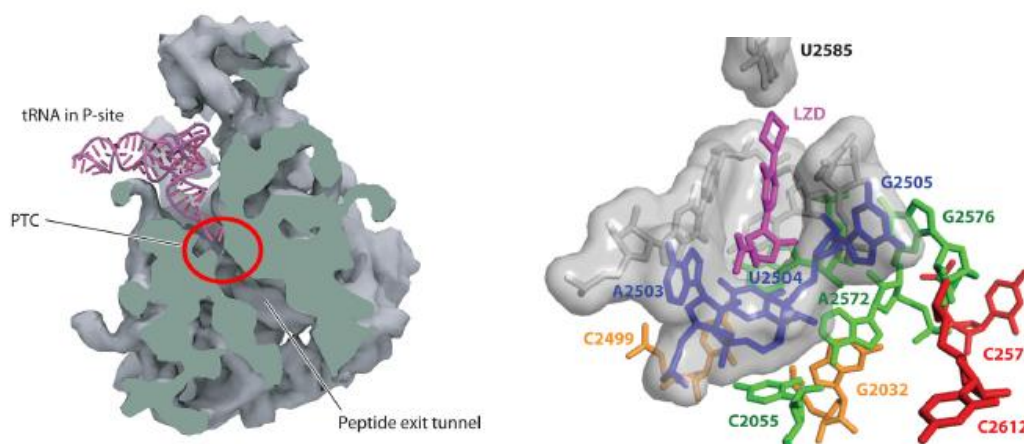


Figura 8. Sitio de unión del linezolid e interacción con nucleótidos cercanos (Fuente: Long & Vester, 2012).

#### 1.4.2 Mecanismos de resistencia a linezolid

Los mecanismos de resistencia a linezolid pueden dividirse en dos grupos, mutaciones en genes no transferibles y adquisición de genes transferibles entre bacterias mediante elementos genéticos móviles (EGM).

##### 1) Mutaciones en genes no transferibles

Las mutaciones en el ARNr 23S es uno de los principales mecanismos de resistencia al linezolid. La mutación más frecuente es G2576T (la mutación consiste en la sustitución de una guanina por una timina, en la posición 2576), presente tanto en enterococos como estafilococos, y que con frecuencia está asociada a un tratamiento prolongado con linezolid. Otras mutaciones encontradas en el ARNr 23S han sido T2500A y G2447T, aunque solo detectadas en *Staphylococcus* (Long & Vester, 2012). En cepas de enterococos se han detectado las siguientes mutaciones: G2505A, G2512T, G2513T y C2610G (Stefani et al., 2010).

Las proteínas ribosomales también pueden presentar mutaciones en sus genes que provocan cambios aminoacídicos que confieren resistencia al linezolid. La proteína L3 está codificada por el gen *rpIC*, y posee un dominio globular en la superficie de la subunidad ribosomal 50S, además de ser una de las proteínas ribosomales más cercanas al sitio de formación del enlace peptídico (Bosling et al., 2003). Los cambios aminoacídicos que se han detectado con más frecuencia en esta proteína son L94V (Ikonomidis et al., 2016), G139R, H146R/M156T, H146Q/V154L/A157R, F147L/A157R, G152D, G155R/M169L, A157R y S158F/D159Y (Locke et al., 2009, Long et al., 2012, Rouard et al. 2017). Hay otros cambios aminoacídicos que no tienen efecto en la susceptibilidad reducida a linezolid, como L101V.

El gen *rpID* codifica la proteína ribosomal L4 cuyas mutaciones confieren resistencia al linezolid. Con frecuencia, se detectan las siguientes sustituciones K68N, L108S y N158S, aunque no es seguro su implicación en la resistencia, puesto que K68N y L108S están presentes cuando ocurren mutaciones en ARN 23S también, además de que N158S se considera más un marcador clonal que una mutación de resistencia (Wong et al., 2010). La inserción de una glicina entre los aminoácidos 71 y 72 se considera una alteración implicada en la resistencia al linezolid (Bonilla et al., 2010).

La proteína L22, codificada por el gen *rpIV*, también debería desempeñar un papel importante en la resistencia al linezolid, debido a su proximidad al sitio de unión del antibiótico. Sin embargo, los cambios aminoacídicos en esta proteína no son frecuentes en estafilococos, y aun menos en enterococos (Lee et al., 2017).

## 2) Por adquisición de genes transferibles

Las bacterias también adquieren resistencia a los antibióticos, por genes transferibles adquiridos mediante EGM, lo que implica una mayor diseminación de la resistencia. Los genes *cfr*, *cfrB*, *poxA* y *optrA* están implicados en la resistencia al linezolid (Sadowy, 2018).

El gen *cfr* codifica una metiltransferasa, que modifica el sitio activo ARNr 23S de la subunidad ribosómica 50S y evita que las moléculas de linezolid se unan a él. Se produce una metilación de la adenina en la posición 1503 en el dominio V del ARNr 23S, lo que provoca un fenotipo de multirresistencia. Así, además de a linezolid, el gen *cfr* confiere resistencia a fenicoles, lincosamidas, pleuromitilinas y estreptogramina A (Wang et al., 2015). Este gen es capaz de transferirse mediante plásmidos entre cepas de *S. aureus* y de *S. epidermidis* (Quiles-Melero et al., 2013).

Existe una variante de este gen denominada *cfrB*, que posee un 75% de identidad aminoacídica con el gen *cfr*. Presenta un fenotipo de resistencia muy similar al de *cfr* en cepas de estafilococos (Deshpande et al., 2015).

Otro de los genes que confieren resistencia al linezolid es *optrA* (Oxazolidinone Phenicol Transferable Resistance). El mecanismo de resistencia asociado a este gen es distinto al del *cfr*, pertenece a la familia de proteínas ABC-F (subgrupo de las proteínas dependientes de ATP, pero que carecen de dominio transmembrana) que confiere resistencia a oxazolidinonas y fenicoles, gracias a la protección del ribosoma por estas proteínas (Sharkey et al., 2016). Se encuentra con frecuencia en plásmidos, que puede transmitirse entre enterococos, o entre enterococos y estafilococos (Wang et al., 2015).

Por último, se estudia el gen *poxA* que también confiere resistencia al linezolid. Ese gen codifica una proteína con una similitud aminoacídica del 32% a la codificada por *optrA*. La proteína codificada pertenece a la familia ABC-F de resistencia a antibióticos. Confiere resistencia a fenicoles, oxazolidinonas y tetraciclinas, además de estar asociado a elementos móviles como plásmidos y transposones (Antonelli et al., 2018).

## 1.5 Epidemiología de la resistencia a linezolid en *Enterococcus* y *Staphylococcus*

La resistencia al linezolid representa un importante problema clínico y de salud pública ya que se trata de un antibiótico considerado como tratamiento de último recurso frente a infecciones graves causadas por patógenos Gram-positivos multirresistentes. La aparición de esta resistencia se ha asociado con tratamientos prolongados con linezolid y con su amplio uso en ámbitos hospitalarios.

### 1.5.1 Resistencia a linezolid en *Enterococcus*

En 2001 se publicaron los primeros casos clínicos de *E. faecium* resistentes a linezolid (Gonzales et al., 2001) y la primera descripción en España fue en una cepa *E. faecalis* aislada en 2003 (Sánchez-Gómez et al., 2006). Desde entonces, aunque todavía la mayoría de los patógenos Gram-positivos continúan siendo susceptibles a este antibiótico, la resistencia a linezolid en enterococos ha aumentado considerablemente en nuestro país y en el resto del mundo (Mendes et al., 2014, Bi et al., 2018, Deshpande et al., 2018, Mendes et al., 2018).

Tradicionalmente la resistencia a linezolid en *Enterococcus* se ha asociado a mecanismos no transferibles, principalmente por mutaciones en el dominio V del ARNr 23S, siendo G2576T la alteración más frecuente (Long & Vester, 2012) y en menor medida por mutaciones en los genes codificantes de genes de proteínas ribosomales L3 (*rplC*), L4 (*rplD*) y L22 (*rplV*) (Locke et al., 2009, Bonilla et al., 2010, Lee et al., 2017). En 2010, en el congreso 50<sup>th</sup> ICAAC se comunicó la existencia de cepas de enterococos que presentaban el gen *cfr*. En 2012, en China, se caracterizó por primera vez una cepa *E. faecalis* de origen animal portadora de este gen (Liu et al., 2012) y la primera cepa clínica humana aislada caracterizada con este mecanismo de resistencia a linezolid mediado por el gen *cfr* presente en un plásmido transferible (Díaz et al., 2012). Los plásmidos o transposones que albergan el gen *cfr* frecuentemente llevan genes de resistencia a otros antibióticos lo que implica una posible coselección de la resistencia.

Se ha descrito también ocasionalmente cepas enterococos resistentes a linezolid portadoras de del gen *cfrB* (Koruda et al 2018).

En 2015, se describió un nuevo gen *optrA* en *E. faecalis* y *E. faecium* de origen animal y humano aisladas en China resistentes a oxazolidinonas carentes del gen *cfr* y sin mutaciones en el ARNr 23S que pudieran explicar esta resistencia (Wang et al., 2015). Desde entonces el gen *optrA* se ha detectado en *Enterococcus* de países de distintos continentes y zonas geográficas de Asia, Pacífico, América del Norte, América Latina y Europa (Gawtryszewska, 2017, Deshpande et al., 2018, Cámara et al., 2019, Tsilipounidaki, 2019, Moure et al., 2020). El gen se ha detectado frecuentemente en plásmidos, pero también localizado en el cromosoma. Se ha detectado tanto la diseminación clonal como la transferencia del plásmido portador del determinante de la resistencia (Deshpande et al., 2018). Estudios retrospectivos en colecciones de cepas clínicas de *Enterococcus* demuestran un aumento del 0,4 al 3,9% durante el período de vigilancia de 10 años del 2004 al 2014 en China (Cui et al., 2017).

Un reciente estudio llevado a cabo por el grupo de la UR en cepas clínicas *E. faecalis* y *E. faecium* describe el gen *optrA* como principal mecanismo implicado en la resistencia a linezolid entre *E. faecalis*, mientras que en *E. faecium* la presencia de mutaciones en el dominio V del ARNr 23S es la causa principal de la resistencia a linezolid. (Ruiz-Ripa, 2020)

En 2018, se describió el nuevo gen *poxA* que confiere una menor susceptibilidad a las oxazolidinonas, fenicoles y tetraciclina, en una cepa clínica de *S. aureus* resistente a meticilina (Antonelli, 2018), y que posteriormente también se ha descrito en el género *Enterococcus* (Papagiannitsis et al., 2019, Moure et al., 2020) El grupo de la UR describió recientemente este gen en nuestro país (Ruiz-Ripa, et al., 2020b).

### 1.5.2 Resistencia a linezolid en *Staphylococcus*

La creciente resistencia a los antibióticos de este género bacteriano, especialmente el aumento de cepas resistentes a meticilina, conlleva a una disminución de las expectativas terapéuticas. En este sentido, el linezolid se ha convertido en la principal opción terapéutica frente a estas bacterias y su creciente uso ha determinado un aumento en la aparición de cepas resistentes, aunque su prevalencia sigue siendo escasa y más común en SCoN que en SCoP como *S. aureus*.

Poco después de la autorización del linezolid para uso en clínica humana se describe la primera cepa clínica de *S. aureus* resistente a meticilina y a linezolid que presentaba la mutación G2576T en el ARNr 23S (Tsiodras et al., 2001). Esta mutación en la diana del antibiótico es el principal mecanismo de resistencia al linezolid en *Staphylococcus*. Este género bacteriano presenta hasta 7 alelos del gen ARNr 23S. La secuencia de estos alelos puede ser distinta relacionándose un

incremento de la resistencia con un mayor número de copias mutadas, además la aparición de una primera mutación en un alelo facilita la aparición de mutaciones sucesivas en los demás alelos (Besier et al., 2008).

También se ha descrito resistencia a linezolid en *Staphylococcus* asociada a cambios aminoacídicos, inserciones y deleciones en las proteínas ribosomales L3, L4 y L22. Hasta la fecha se han descrito múltiples mutaciones, tanto en el ARNr 23S como en los genes codificantes de las proteínas ribosomales, asociadas con una disminución de la susceptibilidad a linezolid. El grupo de la UR ha descrito por primera vez varias de estas mutaciones (Lozano et al., 2013).

Después de la primera descripción de la resistencia a linezolid en *S. aureus* debida a mutaciones en la diana, otros trabajos, algunos realizados por el grupo de la UR; han detectado esta resistencia en otras especies de SCoN (Seral et al., 2011, Gu et al., 2013, Lozano et al., 2013, Musumeci et al., 2016).

El gen *cfr* se describe por primera vez en el año 2000 en el plásmido pSCFS1 en una cepa de *S. sciuri* de origen bovino (Schwarz et al., 2000). En 2007, se informa del primer caso clínico humano de una cepa SARM resistente a linezolid mediada por el gen *cfr* (Toh et al., 2007) y un año después se describen en Estados Unidos dos nuevos casos en aislados clínicos de *S. epidermidis* y *S. aureus* (Mendes et al., 2008). En 2010 se publica un brote en España causado por una cepa SARM en la que se detecta el gen *cfr* como mecanismo responsable de la resistencia a linezolid con ausencia de la mutación G2576T en el ARNr 23S (Morales et al., 2010). Desde entonces se han publicado numerosos casos de cepas *Staphylococcus* multirresistentes portadoras de este gen (Mendes et al., 2010, Baos et al., 2013, Brender et al., 2015, Rodríguez-Lucas et al., 2019), pero también en otras especies tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Shen et al., 2013) siendo en muchos casos cepas de origen animal (Witte and Cuny, 2001, Wang et al., 2015). El grupo de la UR ha publicado recientemente la primera cepa SARM-CC398 *cfr*-positivo en España (Ruiz-Ripa et al., 2020a).

Como ya se ha comentado en los últimos años se han descrito nuevos genes transferibles que confieren resistencia al linezolid. El gen *optrA* también se ha detectado en el género *Staphylococcus*, siendo la primera descripción en una cepa de *S. sciuri* en un plásmido portador del gen *optrA* y *cfr* (Li et al., 2016). El nuevo gen *poxA* que confiere una menor susceptibilidad a las oxazolidinonas, fenicoles y tetraciclina, se detectó por primera vez en una cepa clínica de *S. aureus* resistente a la meticilina (Antonelli, et al., 2018).

## 1.6 Otros Antibióticos

### 1.6.1 $\beta$ -lactámicos

Este grupo de antibióticos es el más numeroso y diverso. Incluye antibióticos pertenecientes a varios subgrupos como penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos. La estructura común en todos ellos es un anillo  $\beta$ -lactámico. Este tipo de antibióticos actúa inhibiendo la síntesis del peptidoglicano de la pared celular de las bacterias (Nester et al., 2001). Esta inhibición se debe a que los  $\beta$ -lactámicos son similares a la D-alanil-D-alanina, presente como residuo terminal en las unidades peptídicas precursoras de la barrera del peptidoglicano. La semejanza estructural entre ambas moléculas facilita el anclaje de los  $\beta$ -lactámicos en el sitio activo de las PBPs (Proteínas de Unión a la Penicilina), así la unión irreversible entre  $\beta$ -lactámicos y PBPs evita la transpeptidación celular, lo que provoca la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana (Hayes et al., 1981).

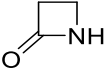
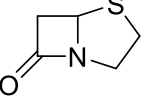
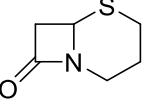
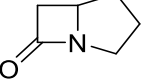
El gen *blaZ* codifica una  $\beta$ -lactamasa que hidroliza el anillo  $\beta$ -lactámico, y en la actualidad, gran parte de los aislados de *Staphylococcus* presentan resistencia a la penicilina por la expresión de este gen.

Para evitar el problema de la resistencia a la penicilina, se buscaron nuevos antibióticos como la meticilina y sus derivados, pero aun así aparecieron cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (denominadas SARM); estas cepas son capaces de sintetizar PBPs modificadas (PBP2a) con una baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos.

Las cepas de *Staphylococcus* producen 4 tipos de PBPs (conocidas como PBP1, PBP2, PBP3 y PBP4), todas ellas inhibidas por la acción de los  $\beta$ -lactámicos. En cambio, las cepas SARM producen otro tipo adicional de PBP (PBP2a o PBP2') que son capaces de mantener la síntesis del peptidoglicano, y por ello de la pared bacteriana. La PBP2a está codificada por el gen *mecA* (y en casos muy inusuales por los genes *mecB* y *mecC*), que además confiere resistencia a meticilina y a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Además, las cepas SARM suelen presentar resistencia a otras familias de antibióticos (Benito Pascual, 2015).



Tabla 1. Estructura y nomenclatura de los anillos  $\beta$ -lactámicos.

Estructura	Anillo secundario	Núcleo del $\beta$ -lactámico	Grupo antibiótico
	-	Monobactamo	Monobactámicos
	Anillo tiazolidínico	Ácido 6-aminopenicilánico	Penicilinas
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7- $\alpha$ -cefalosporínico	Cefalosporinas
	Anillo pirrolínico	Carbapenemo	Carbapenémicos

### 1.6.2 Macrólidos-Lincosamidas-Estreptograminas (MLS)

Estos 3 grupos de antibióticos comparten mecanismos de acción y de resistencia, sin embargo, se diferencian en su estructura química. Los antibióticos más comunes y característicos de estos grupos son eritromicina, clindamicina y lincomicina. Afectan a la síntesis proteica en diferentes niveles de la translocación peptídica, inhibiendo la unidad 50S de los ribosomas bacterianos (Portillo et al., 2000, Benito Pascual, 2015).

En bacterias Gram-positivas, se han descrito distintos mecanismos de resistencia:

- Inactivación del antibiótico debido a la acción de las enzimas codificadas por genes como *lnuA*, *lnuB*, *lnuC*, *vat*, *vgaB* y *mphC*.
- Modificación de la diana (ARNr 23S) por las metilasas codificadas por los genes *erm*, por el gen *cfr* en alguna ocasión, o por mutaciones en el ARNr 23S o en las proteínas ribosomales L3, L4 y L22.
- Expulsión del antibiótico al exterior de la bacteria mediante la acción de bombas de eflujo codificadas por los genes: *msrA*, *msrB*, *erpB*, *mefE*, *vgaA*, *vgaB*, *vgaC*, *vgaD*, *vgaE*, *lsaA*, *lsaB*, *lsaC*, *lsaE*.

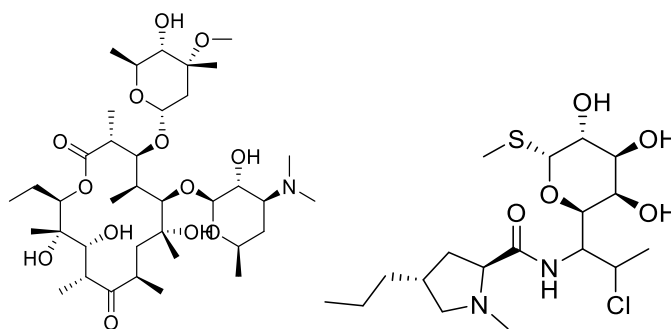


Figura 9. Estructura de la eritromicina (Macrólido) y clindamicina (Lincosamida) (Elaboración propia)

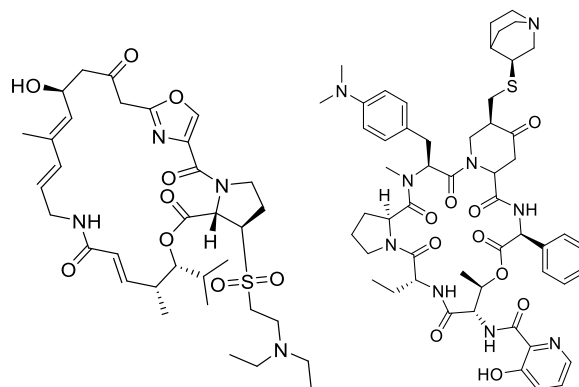


Figura 10. Estructuras de dalfopristina y quinuistina (Streptograminas) (Elaboración propia)

### 1.6.3 Tetraciclinas

Este tipo de antibióticos actúan inhibiendo la síntesis proteica, uniéndose también a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Klare et al., 2005).

Se conocen 2 tipos de mecanismos codificados por genes de resistencia, que confieren resistencia a este grupo:

- Los genes *tetK* y *tetL* codifican bombas de eflujo que favorecen la expulsión del antibiótico.
- Los genes *tetM* y *tetO* modifican la diana mediante la protección del ribosoma.
- El gen *poxA* confiere una reducida susceptibilidad a estos antibióticos.

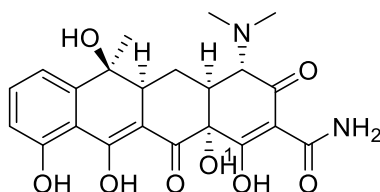


Figura 11. Estructura de la tetraciclina (Elaboración propia)

### 1.6.4 Aminoglucósidos

Los antibióticos más característicos y usados dentro de esta familia son la tobramicina, kanamicina, gentamicina y estreptomicina. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis proteica, ya que se unen de forma irreversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano. De esta manera, interfieren en la elongación de la cadena peptídica y puede llevar a una traducción del ARNm equivocada que podrá provocar, la síntesis de proteínas anómalas y no funcionales (Torres & Cercenado, 2010, Benito Pascual, 2015).

Los mecanismos de resistencia, pueden ser de varios tipos:

- Defectos en la entrada del antibiótico al interior de la bacteria por un problema de permeabilidad.
- Alteraciones en los ribosomas bacterianos
- Modificación enzimática del antibiótico que provoca la pérdida de afinidad con el ribosoma. Algunas de estas enzimas están codificadas por genes como *aac(6')-Ie-aph(2'')*-la (enzima bifuncional, confiere resistencia a tobramicina, gentamicina y kanamicina), *ant(4')*-la (confiere resistencia a kanamicina y tobramicina), *ant(6)*-la (confiere resistencia a estreptomicina) y *aph(3')*-IIa (confiere resistencia a kanamicina)

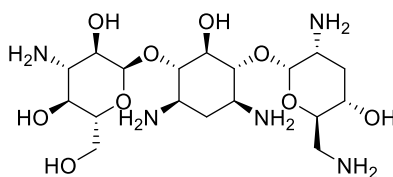


Figura 12. Estructura de la tobramicina (Elaboración propia).

### 1.6.5 Fenicoles

El antibiótico más representativo de este grupo es el cloranfenicol. Actúa sobre la subunidad 50S del ribosoma, inhibiendo a la enzima peptidil transferasa, que bloquea la síntesis de proteínas.

Los mecanismos detectados para fenicoles no fluorados son los codificados por los genes *cat<sub>pC221</sub>*, *cat<sub>pC223</sub>*, *cat<sub>ps194</sub>*, y también en menor medida por *cfr*, *fexA*, *fexB*, *optrA* y *poxA*, tanto para fenicoles fluorados como aquellos que no lo están (Benito Pascual, 2015).

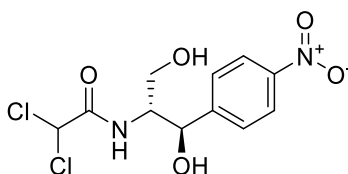


Figura 13. Estructura del cloranfenicol (Elaboración propia).

### 1.6.6 Mupirocina

Esta familia de antibióticos actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana, evitando la unión de la enzima isoleucil-ARNt-sintetasa. Se impide la incorporación de la isoleucina en la cadena peptídica.

La resistencia de la bacteria puede darse mediante la mutación del gen codificante de esta enzima (*ileS*) o por genes de resistencia específicos como *mupA* o *mupB* (Benito Pascual, 2015).

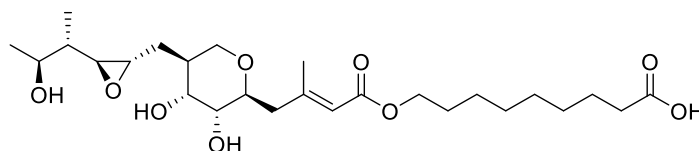


Figura 14. Estructura de la mupirocina (Elaboración propia).

### 1.6.7 Glucopéptidos

El máximo representante de esta familia es la vancomicina. Se encargan de impedir el proceso de transglicosilación en la síntesis de la pared celular de la bacteria, uniéndose a las moléculas precursoras, N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico. Este tipo de antimicrobiano, actúa sobre los precursores del peptidoglicano, frente a los  $\beta$ -lactámicos que actuaban directamente sobre las enzimas encargadas de la síntesis de este (Torres & Cercenado, 2010).

Existen diferentes mecanismos de resistencia a vancomicina, relacionados con la expresión de operones *van*, siendo el más frecuente el asociado al operón *vanA*, que contiene el gen estructural *vanA* y que provoca la síntesis de un precursor del peptidoglicano modificado, al cual no se une la vancomicina (Benito Pascual, 2015).

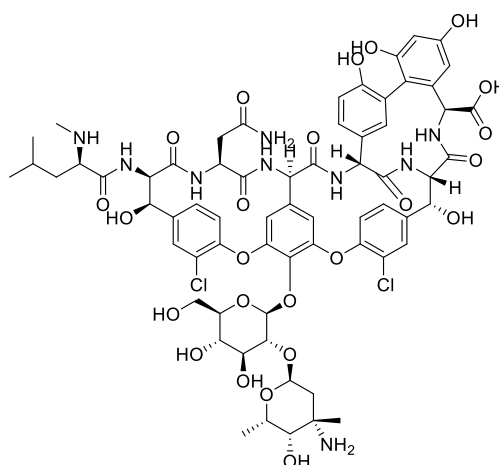


Figura 15. Estructura de la vancomicina (Elaboración propia).

### 1.6.8 Fusidanos

El ácido fusídico y sus derivados basan su acción antibiótica en la unión al factor de elongación G (FE-G), de manera que impiden la liberación del ribosoma durante la síntesis proteica bacteriana (Benito Pascual, 2015).

La resistencia frente a este antibiótico puede ocurrir por varios mecanismos:

- Mutaciones en el gen *fusA*, encargado de codificar el factor de elongación (FE-G)
- Adquisición del gen *fusB*, que se encarga de la codificación de una proteína unida al FE-G y lo protege del antibiótico.
- Recientemente se han descubierto genes como *fusC*, *fusD* y *fusE* claves también en la resistencia frente a esta familia de antibiótico.

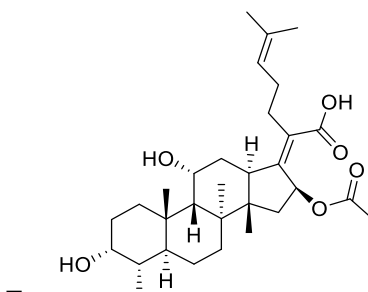


Figura 16. Estructura del ácido fusídico (Elaboración propia).

### 1.6.9 Diaminopirimidinas

El agente antimicrobiano característico de este grupo es el trimetoprim, encargado de inhibir a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), por lo que se reduce la síntesis de los precursores de las bases nitrogenadas del ADN.

Existen diversos mecanismos de resistencia como la expulsión directa por permeabilidad relativa o por eflujo, la mutación de los genes codificantes de la enzima (*dfr*), o la producción de enzimas DHFR adicionales o la sobreproducción de enzimas DHFR codificadas por *dfrA*, *dfrD*, *dfrG* y *dfrK* (López et al., 2012, Benito Pascual, 2015).

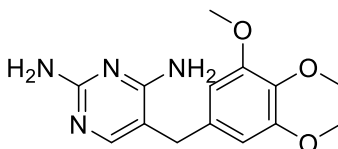
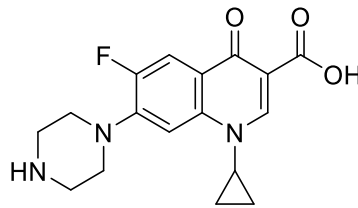


Figura 17. Estructura del trimetoprim (Elaboración propia).

### 1.6.10 Quinolonas

El ácido nalidixico y el ciprofloxacino destacan entre este grupo de antibióticos sintéticos. Actúan inhibiendo la acción de las enzimas ADN-girasa cromosómica y ADN-topoisomerasa IV. Se inhibe la multiplicación bacteriana y la replicación del ADN.

Los mecanismos de resistencia están asociados a mutaciones en las subunidades de la ADN-topoisomerasa IV (GrlA y GrlB) o la ADN-girasa (GyrA y GyrB), o mediante mutaciones en el gen *norA* que se encarga de alterar la difusión de quinolonas a la bacteria por bombas de eflujo (López et al., 2011, Benito Pascual, 2015).



*Figura 18. Estructura del ciprofloxacino (Elaboración propia)*

## 2 OBJETIVOS DEL TRABAJO

### Objetivo general

Estudiar los mecanismos de resistencia a linezolid en una colección de 18 cepas clínicas de *Staphylococcus* y de *Enterococcus* procedentes de dos hospitales de dos CC.AA. diferentes.

### Objetivos específicos

- 1) Estudiar en la colección de cepas el genotipo de resistencia.
- 2) Determinar los mecanismos de resistencia a linezolid en dicha colección.
- 3) Identificar las mutaciones que confieren resistencia mediante herramientas bioinformáticas.

### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Aislamiento de las cepas

Las 18 cepas de *Staphylococcus* spp y de *Enterococcus* spp incluidas en este estudio proceden de los laboratorios de Microbiología del Hospital San Pedro de Logroño (HSP) y del Hospital Arnau Vilanova de Lérida (HAV). Estas cepas bacterianas han sido aisladas como parte de la rutina de dichos laboratorios y han sido cedidas gracias a la colaboración del grupo de investigación donde se ha realizado este TFG con los Dres. José Manuel Azcona y Carla Andrea Alonso del HSP y la Dra. Alba Bellés del HAV. El listado de dichas cepas se encuentra detallado en la Tabla 2 y su frecuencia por especies en la Figura 19. La mayor parte de estas cepas (n=16) estaban conservadas en tubos de leche descremada (BD Difco) a -80°C en la Universidad de La Rioja cuando se inició este TFG y las dos restantes fueron aportadas a lo largo del desarrollo del mismo. Por ello, el primer paso consistió en la búsqueda de las cepas de el arcón de -80°C y en su cultivo en placas de BHI (Brain Heart Infusion) agar (Condalab), mediante el método de aislamiento por agotamiento por estría. De esta manera se obtuvieron cultivos puros de las bacterias para su posterior uso.

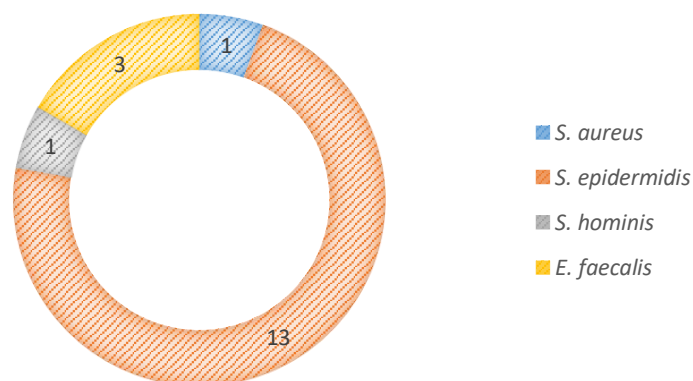


Figura 19. Número de cepas de cada especie estudiadas (Elaboración propia).

El método de trabajo seguido fue el siguiente:

- 1) Se esteriliza el asa de siembra en el mechero Bunsen.
- 2) Se deja enfriar, siempre cerca de la llama y se toma una alícuota del tubo de leche que contiene la bacteria.
- 3) Se transfiere este inóculo a un área pequeña de superficie de la placa, cerca del borde. Se extiende formando estrías muy juntas en una porción pequeña de la placa.



## Material y método

Tabla 2. Características de las 18 cepas resistentes a linezolid incluidas en este estudio.

CEPA	ESPECIE	MUESTRA	Hospital <sup>1</sup>	FENOTIPO RESISTENCIA <sup>2</sup>
<b>X1762</b>	<i>E. faecalis</i>	Orina	HAV	OXA, GEN, AMK, TOB, LEV, ERI, CLI, SXT, LZD
<b>X1763</b>	<i>E. faecalis</i>	Úlcera	HAV	GEN, LZD
<b>X2219</b>	<i>E. faecalis</i>	Orina	HSP	CIP, LEV, STR, GEN, SXT, LZD
<b>X1846</b>	<i>S. aureus</i> SARM	Úlcera	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, CLI, LZD
<b>X2220</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, OXA, FOX, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, RIF, SXT, FOS
<b>X2221</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, Q/D, LZD, SXT, PRI
<b>X2222</b>	<i>S. epidermidis</i>	Catéter	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, Q/D, TEC, LZD, SXT, PRI
<b>X2223</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, TET <sup>(1)</sup> , LZD, SXT, MUP
<b>X2224</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT, MUP
<b>X2085</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HAV	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT <sup>(1)</sup> , FOS
<b>X2307</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT <sup>(1)</sup> , FOS
<b>X2308</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT <sup>(1)</sup> , FOS
<b>X2309</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT <sup>(1)</sup> , MUP
<b>X2310</b>	<i>S. epidermidis</i>	Drenaje	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT <sup>(1)</sup> , MUP
<b>X2311</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, TET <sup>(1)</sup> , LZD, SXT, FOS
<b>X2313</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT, FOS
<b>X2314</b>	<i>S. epidermidis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, Q/D, LZD, SXT, PRI
<b>X2312</b>	<i>S. hominis</i>	Hemocultivo	HSP	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, MUP

<sup>1</sup>HAV: Hospital Arnau-Villanova de Lérida; HSP: Hospital San Pedro de Logroño.

<sup>2</sup>AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Ácido clavulánico; CIP: Ciprofloxacino; CLI: Clindamicina; ERI: Eritromicina; FOS: Fosfomicina; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; LEV: Levofloxacino; LZD: Linezolid; MUP: Mupirocina; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina; PRI: Pristinamicina; Q/D: Quinupristin/Dalfopristin; RIF: Rifampicina; STR: Estreptomicina; SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol; TEC: Teicoplanina; TET: Tetraciclina.

<sup>(1)</sup>Resistencia intermedia

- 4) Se esteriliza una vez más el asa y se deja enfriar. Se toma como nuevo inóculo el obtenido mediante la estriación anterior, y se realiza sobre otra porción de la placa y una segunda estriación, sin que entre en contacto con la primera.
- 5) Se esteriliza de nuevo el asa, y se repite el proceso anterior, pero tomando como inóculo la segunda tanda de estrías.
- 6) Se flamea el asa, y se incuba la placa en posición invertida durante 24 horas, a 37°C. Se incuba en esta posición para que el agua de condensación no se deposite sobre la superficie del agar, ya que esto nos impediría obtener colonias aisladas.

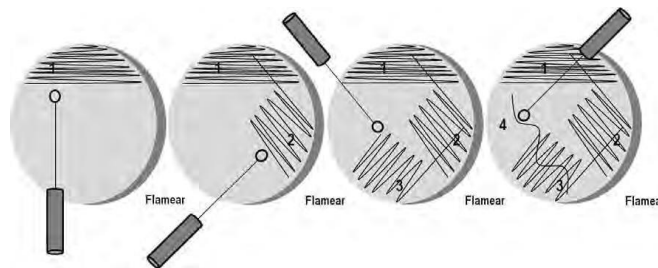


Figura 20. Siembra por agotamiento por estría (Fuente: Rojas Triviño, 2011)

Las dos cepas que fueron remitidas desde el HSP y HAV durante el desarrollo del TFG, fueron suministradas en placas de agar sangre. Por ello, se procedió a su pase a una placa de BHI para obtener colonias aisladas y asegurar que se trataba de un cultivo puro. Posteriormente se guardaron las cepas en la colección del grupo de investigación, dándole un número de registro consecutivo. El cultivo de las cepas se realiza como se ha indicado anteriormente.

Una vez incubadas las placas, se realiza una siembra en extensión, para obtener un cultivo bacteriano puro. Para ello, se esteriliza el asa de siembra, y se coge como inóculo una colonia aislada de la siembra por estrías. Se siembra, pasando el asa de siembra por la superficie del agar. Si sembramos más de una cepa en la misma placa, se debe tener cuidado para que estas no se toquen entre sí, y así evitar cualquier contaminación posible.



Figura 21. Siembra en extensión de distintos microorganismos (Fuente: Banco de imágenes, dominio público)

### 3.2 Determinación de la sensibilidad a antibióticos

Los datos de sensibilidad a diferentes antibióticos fueron aportados por los microbiólogos de los hospitales HSP y del HAV ya que forman parte de la rutina del laboratorio. Sin embargo, en este TFG se ha estudiado la sensibilidad a un antibiótico adicional, el cloranfenicol, el cual no tiene interés clínico (no se usa por su toxicidad, excepto por vía tópica) pero si tiene mucho interés epidemiológico, ya que pueden ser un marcador para la búsqueda de cepas resistentes a linezolid. La sensibilidad a este antibiótico fue testada mediante el método de difusión por disco o antibiograma.

Para realizar el estudio de sensibilidad, se partió de un cultivo puro de las cepas en medio sólido (BHI agar) incubado a 37°C durante 24 horas. El procedimiento que debemos seguir es el siguiente:

- 1) Con el asa de siembra previamente esterilizada, se toma 1-2 colonias del cultivo puro y se resuspenden en una disolución salina estéril de NaCl 0,9%, hasta conseguir una suspensión bacteriana de 0,5 McFarland (equivalente a  $5 \cdot 10^8$  UFC/ml)
- 2) Con un hisopo o torunda estéril, se inocula la superficie de una placa de Mueller-Hinton (Condalab), extendiendo la suspensión bacteriana, de manera homogénea en todas las direcciones.
- 3) Se coloca el disco de antibiótico (Oxoid) con ayuda de unas pinzas esterilizadas, presionando ligeramente para asegurarnos que hace contacto con el agar. Si tenemos que poner más de un disco, es recomendable que estén separados 1-2 cm, para que los halos se puedan diferenciar y no se corten entre ellos.
- 4) Se incuba la placa en posición invertida durante 24 horas a 37°C.

Tras este periodo de incubación, se midió el halo de inhibición obtenido, expresado en milímetros. Los resultados se interpretaron según los criterios del EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019) o CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute, 2019) (Ver Tabla 3 y Figura 23).

*Tabla 3. Carga del disco antibiótico empleados y los halos de inhibición para el estudio de Staphylococcus y Enterococcus.*

Antibiótico	Carga (µg)	Halo de inhibición			Referencia
		R	I	S	
<b>Cloranfenicol (CHL)</b>	30	≤12	13-17	≥18	CLSI 2019

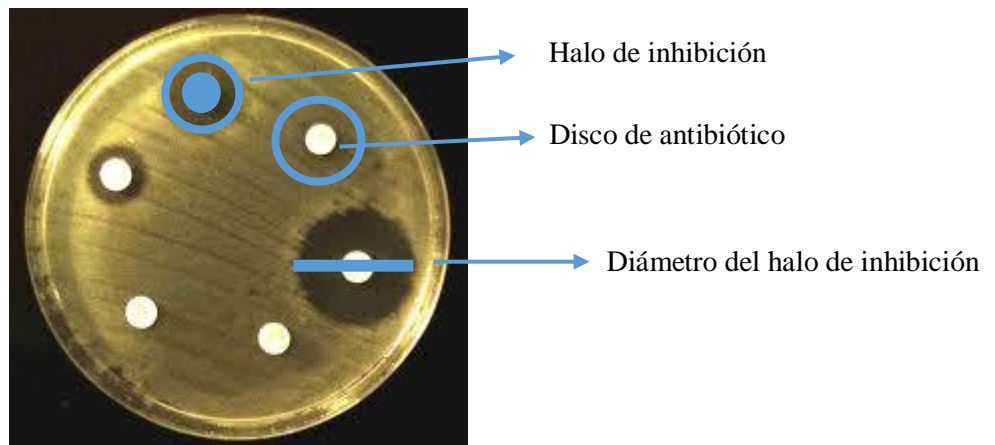


Figura 22. Antibiograma

Los hospitales colaboradores actualmente trabajan con la técnica MicroScan® para la detección de la sensibilidad a los distintos antibióticos. Consiste en un método de automatización microbiológico, por microdilución, consistente en paneles con pocillos miniaturizados que contienen los antimicrobianos en diferentes concentraciones. Según sea el punto de corte, se permite diferenciar cepas resistentes de las intermedias o de las sensibles. Mediante turbidimetría se establecen las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CIM en  $\mu\text{g/ml}$ ) de cada una de las cepas. Además, estos equipos disponen de un software acoplado que permite la interpretación de los datos. En las tablas 1 y 2 del anexo se incluyen los puntos de corte (CMI) de sensibilidad/resistencia para todos los antibióticos testados en los dos hospitales.

### 3.3 Extracción de ADN de las cepas

#### 3.3.1 Extracción de ADN en *Staphylococcus*

El método utilizado para la extracción ADN en *Staphylococcus* se basa en la extracción con lisostafina y proteinasa K, como se detalla a continuación:

- 1) Resuspender una colonia en 45  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ y añadir 5  $\mu\text{L}$  de lisostafina 1  $\text{mg/mL}$  (Sigma Aldrich). Vortear
- 2) Se incuba en un baño termostático a 37 °C durante 10 minutos.
- 3) Se añaden 45  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ, 150  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl (0,1 M, pH=8), y 5  $\mu\text{L}$  de proteinasa K 2  $\text{mg/mL}$  (Sigma Aldrich). Vortear.
- 4) Se incuba a 60 °C en un baño termostático, durante 10 minutos.
- 5) Se incuba durante 5 minutos, en un baño termostático a 100 °C.

- 6) Se centrifuga durante 3 minutos a 12000 rpm.

### 3.3.2 Extracción de ADN en *Enterococcus*

Para la extracción de ADN en *Enterococcus* se usa un método distinto basado en el uso de una matriz InstaGene Matrix (BioRad). El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

- 1) Se resuspende una colonia en 1 mL de agua MilliQ. Se vortea.
- 2) Se centrifuga 1 minuto a 12000 rpm. Eliminamos el sobrenadante.
- 3) Se vuelve a resuspender en 200  $\mu$ L de InstaGene Matrix.
- 4) Se incuba a 56 °C durante 20 minutos, en un baño termostático. Se vortea.
- 5) Se incuba durante 8 minutos en un baño termostático. Se vortea.
- 6) Se centrifuga 3 minutos a 12000 rpm.

### 3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, por las siglas en inglés (Polimerase Chain Reaction) es una técnica de biología molecular, que permite amplificar fragmentos de ADN, determinados por un par de cebadores.

Una PCR consiste en una repetición desde 20 a 35 ciclos de una serie de 3 etapas (desnaturalización, hibridación, extensión del ADN) caracterizadas por el desarrollo en distintas temperaturas. Las temperaturas y el tiempo que aplicamos a cada una de ellas dependen de varios factores como pueden ser la concentración de dNTPs y de iones divalentes, la temperatura de unión de los cebadores o primers, la enzima usada para la síntesis de ADN y también la longitud de la secuencia de ADN que queramos amplificar.

- Etapas 1: Inicio. Elevamos la temperatura a 94-96 °C y la mantenemos durante unos minutos, para conseguir la separación completa de las hebras de ADN.
- Etapas 2: Desnaturalización. El ADN se desnaturaliza, es decir, se separa en las dos cadenas que lo forman. Se produce por un calentamiento en torno a 95 °C.
- Etapas 3: Hibridación. En esta etapa el primer se une a su secuencia complementaria en la hebra molde de ADN, se enfría a 45-65 °C (en función del primer que estemos usando) para permitir el alineamiento. La polimerasa une el cebador con la hebra molde, y se empieza a sintetizar la nueva cadena de ADN.

- **Etapa 4: Elongación de la cadena.** La polimerasa se encarga de ir sintetizando nuevas cadenas de ADN, va añadiendo los dNTPs en sentido 5'→ 3', uniendo el grupo 3'-hidroxilo de la hebra de ADN con el grupo 5'-fosfato de los dNTP. Esta temperatura depende de la enzima polimerasa que se use, como usamos Taq, esta temperatura suele rondar los 72 °C.
- **Etapa 5: Elongación final.** Esta etapa sirve para asegurarnos de que cualquier cadena simple de ADN esté ampliado. Para ello mantenemos la temperatura, en torno a 70-74 °C durante unos 5-15 minutos.
- **Etapa 6: Conservación.** Se deja el termociclador a una temperatura de 4 °C para conservar los fragmentos de ADN sin alteraciones.

Para poder realizar la PCR, es necesario añadir los componentes incluidos en la Tabla 4.

*Tabla 4. Reactivos usados en una reacción de PCR para un volumen de 50 µL.*

<i>Componentes</i>	<i>Concentración inicial</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen por tubo</i>
<i>Cebador forward (Sigma Aldrich)</i>	25 µL	0,5 µL	1 µL
<i>Cebador reverse (Sigma Aldrich)</i>	25 µL	0,5 µL	1 µL
<i>Tampón de reacción NH<sub>4</sub> (Bioline)</i>	10X	1X	5 µL
<i>MgCl<sub>2</sub> (Bioline)</i>	50 mM	1,5 mM	1,5 µL
<i>dNTPs (Bioline)</i>	2,5 mM	2 mM	1 µL
<i>BioTaq DNA polimerasa (Bioline)</i>	5 U/ µL	0,03 U/ µL	0,3 µL
<i>Agua miliQ estéril</i>	-	-	30,2 µL
<i>ADN</i>	-	-	10 µL

- Los cebadores o primers, son oligonucleótidos complementarios de las secuencias de ADN, que flanquean el gen o la secuencia que queremos copiar en cada cadena de ADN. Suelen ser secuencias cortas de entre seis y cuarenta nucleótidos permitiendo a la polimerasa iniciar la reacción.
- Los dNTPs son desoxirribonucleótidos trifosfato necesarios para sintetizar las nuevas cadenas de ADN.

- La disolución tampón de  $\text{NH}_4$  que se encarga de mantener el pH, en el rango adecuado para que la ADN polimerasa funcione correctamente.
- Los iones divalentes como el  $\text{Mg}^{+2}$ , agregado como cloruro de magnesio, se encargan de actuar como cofactores de la polimerasa.
- La polimerasa Taq es una ADN polimerasa resistente al calor, debido a que se aísla de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*.

En todas las reacciones de PCR se requiere incluir controles positivos (ADN con el gen que se desea testar) y negativos (ADN sin el gen que se está testando o muestra sin ADN).

En la tabla 5 se indican todos los cebadores usados en las reacciones de PCR empleadas en este TFG para el estudio de genes, con sus secuencias nucleotídicas, el tamaño de amplicón de ADN esperado y las condiciones de la PCR.

Tabla 5. Secuencias y condiciones de amplificación de los genes.

Cebadores	Secuencias (5'→3') (Tamaño del amplicón)	Condiciones		Referencia
ARNr 23S	F: GCGGTCGCCTCCTAAAAG R: ATCCCGGTCCTCTCGTACT (420 pb)	94°C	5 min	(Dibo et al., 2004)
		94°C	1 min	
		54°C	1 min	
		72°C	1 min	
		72°C	7 min	
<i>rplC</i> (L3) <i>Staphylococcus</i>	F: ACCCTGATTAGTTCCGT CTA R: GTTGACGCTTTAATGGGCTTA (799 pb)	94°C	5 min	(Miller et al., 2008)
		94°C	1 min	
		52°C	1 min	
		72°C	1 min	
		72°C	7 min	
<i>rplC</i> (L3) <i>Enterococcus</i>	F: ATGACCAAAGGAATCTTAGGG R: CACAGCTGATTTGATWGTGATT (618 pb)	94°C	7 min	(Diaz et al., 2012)
		94°C	1 min	
		58°C	1 min	
		72°C	1 min	
		72°C	10 min	
<i>rplD</i> (L4) <i>Staphylococcus</i>	F: TCGCTTACCTCCTTAATG R: GGTGGAAACACTGTAAGT (1080 pb)	94°C	5 min	(Miller et al., 2008)
		92°C	1 min	
		54°C	1 min	
		72°C	1 min	
		72°C	7 min	
<i>rplD</i> (L4) <i>Enterococcus</i>	F: GCCGAATGTAGCATTATTCAA R: CAAGCACCTCCTCAATTTGAGT (617 pb)	-	-	(Diaz et al., 2012)

<b><i>rpIV (L22)</i></b> <b><i>Staphylococcus</i></b>	F: CAACACGAAGTCCGATTGGA R: GCAGACGACAAGAAAACAAG (468 pb)	94°C	5 min	30 ciclos	(Mendes et al., 2010)
		94°C	1 min		
		52°C	1 min		
		72°C	1 min		
		72°C	7 min		
<b><i>rpIV (L22)</i></b> <b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	F: GCCACGTTGCTGACGATAA R: ACCCACTGATTGTCCTCCT (476 pb)			-	(Lee et al., 2017)
<b><i>rpIV (L22)</i></b> <b><i>Enterococcus faecium</i></b>	F: GGACATGCTGCTGACGATA R: ACCATTTAGCATCCCAGTCG (486 pb)			-	
<b><i>cfr</i></b>	F: TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA R: ACCATATAATTGACCACAAGCAGC (746 pb)	94°C	3 min	30 ciclos	(Kehrenberg & Schwarz, 2006)
		94°C	1 min		
		94°C	1 min		
		72°C	1 min		
		71°C	5 min		
<b><i>optrA</i></b>	F: AGGTGGTCAGCGAACTAA R: ATCAACTGTTCCCATTC (1395 pb)	94°C	7 min	30 ciclos	(Wang et al., 2015)
		94°C	1 min		
		48°C	1min		
		72°C	1 min		
		72°C	10 min		
<b><i>poxA</i></b>	F: TCAATGCAGAGCAGGAAGCA R: GGTGGATTTACCGACACCGT (791 pb)	94°C	7 min	30 ciclos	(Ruiz-Ripa et al., 2020)
		94°C	1 min		
		60°C	1min		
		72°C	1 min		
		72°C	10 min		
<b><i>cfrB</i></b>	F: TGAGCATATACGAGTAACCTCAAGA R: CGCAAGCAGCGTCTATATCA (293 pb)	94°C	5 min	30 ciclos	(Lee et al., 2017)
		94°C	30s		
		58°C	30 s		
		72°C	1 min		
		72°C	5 min		
<b><i>mecA</i></b>	F: GGGATCATAGCGTCATTATTC R: AACGATTGTGACAGCATAGCC (527 pb)	94°C	5 min	30 ciclos	Community reference Laboratory Antimicrobial Resistance (UE)
		94°C	30 s		
		55°C	30 s		
		72°C	1 min		
		72°C	10 min		
<b><i>blaZ</i></b>	F: CAGTTCACATGCCAAAGAG R: TACACTCTTGCGGTTTC (772 pb)	94°C	3 min	30 ciclos	(Schnellmann, 2006)
		94°C	1 min		
		56°C	1 min		
		72°C	1 min		
		72°C	1 min		
<b><i>ermA</i></b>	F: TCTCAAAAAGCATGTAAAAGAA	93°C	3 min		



<b><i>ermB</i></b>	R: CTTGATAGTTTATTAATATTAG (645 pb)	93°C	1 min	35 ciclos	(Sutcliffe et al., 1996)
		52°C	1 min		
	F: GAAAAGTACTCAACCAAATA	72°C	1 min		
	R: AGTAACGGTACTTAAATTGTTTA (639 pb)	71°C	5 min		
<b><i>ermC</i></b>		93°C	3 min	35 ciclos	
	F: TCAAAACATAATATAGATAAA	93°C	1 min		
	R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT (642 pb)	52°C	1 min		
		72°C	1 min		
<b><i>ant(4')-Ia</i></b>		72°C	5 min	32 ciclos	(van de Klundert & Vliegenthart, 1993)
		94°C	3 min		
	F: GCAAGGACCGACAACATTTC	94°C	30s		
	R: TGGCACAGATGGTCATAACC (165 pb)	60°C	45s		
		72°C	1 min		
		72°C	5 min		

### 3.5 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica muy empleada en bioquímica y biología molecular, ya que permite separar moléculas mediante sus propiedades, como el tamaño, la forma o el punto isoelectrónico. La técnica consiste en aplicar una diferencia de potencial eléctrico que haga que las moléculas se muevan por el gel a diferentes velocidades.

#### 1) Preparación del gel

- Añadir 1 g de agarosa y 100 mL de tampón TBE (Tris Borato y EDTA) 1x (20 mL TBE 5x + 80 mL de agua destilada) y calentar hasta la total disolución de la agarosa.
- Añadir 6 µL de Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH) y agitar. Midori Green es un colorante que permite la visualización de las bandas en el gel de agarosa por intercalarse entre las hebras del ADN.
- Cerrar el molde por los extremos con cinta de forma que esta quede tirante.
- Se colocan los peines y se añade la disolución de agarosa.
- Se deja secar durante unos 15 minutos.

## 2) Carga de las muestras

- Quitar con cuidado los peines para no romper el gel.
- Mezclar 10  $\mu$ L de la muestra con una gota de azul de bromofenol.
- Poner la mezcla en el pocillo de la celda que le corresponde.

## 3) Electroforesis

- Colocar el gel en la cubeta de electroforesis
- La disolución buffer 1X debe rellenar los pocillos, sino se añade hasta que lo haga.
- Se activa el programa con las siguientes condiciones: 45 minutos, 96 V, 120 mA.

## 4) Visualización de los fragmentos

- Gracias a una lámpara UV podemos conseguir una imagen de nuestro gel con las bandas correspondientes. Comparamos las bandas de nuestras cepas con las bandas de los controles, y decidimos si las muestras son positivas o negativas.

### 3.6 Secuenciación del ADN y análisis de las secuencias

Para poder analizar las secuencias de ADN y determinar la existencia de posibles mutaciones en los genes codificantes del ARNr 23S o de las proteínas ribosomales L3, L4 y L22, se requiere la secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos en las técnicas de PCR. Asimismo, se han verificado por secuenciación la presencia de los genes *cfr* y *optrA*. La secuenciación del ADN se realiza en una empresa externa (GENEWIZ) para lo cual se requiere tanto el producto de PCR como el cebador que interese usarse para delimitar el inicio de la secuenciación.

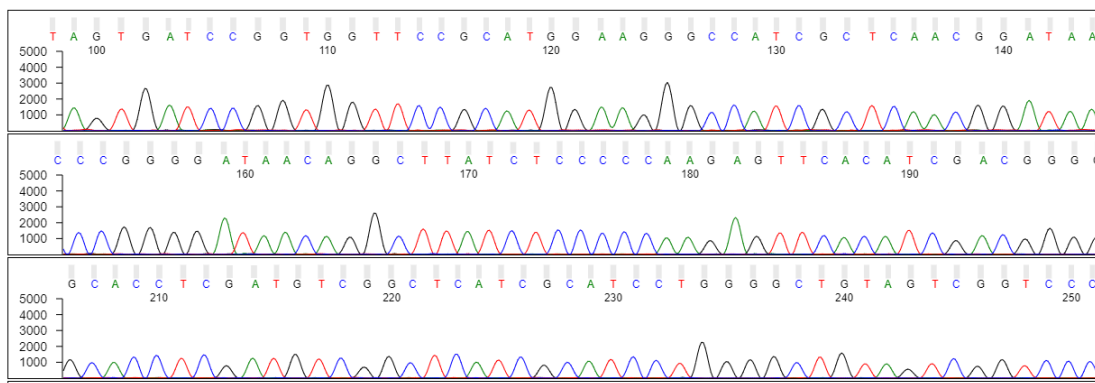


Figura 23. Ejemplo de cromatograma obtenido tras la secuenciación.

Una vez que hemos obtenido los datos de la secuenciación se procede a su análisis mediante programas de bioinformática. Se usa la web EMBOSS Needle ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)) para comparar dos secuencias tanto de aminoácidos como de bases nucleicas (ADN o ARN), mediante alineamientos entre pares de bases o aminoácidos, gracias a la matriz BLOSUM62. Una vez que se han producido los alineamientos, se puede observar con facilidad donde se encuentran las mutaciones o las inserciones y deleciones. Los alineamientos se han realizado entre una secuencia de aminoácidos sin mutaciones obtenida de GenBank (Tabla 6) y nuestras secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias de ADN obtenidas por PCR y secuenciación.

Tabla 6. Secuencia de GenBank para las secuencias de referencia.

<i>Secuencia de GenBank</i>	
<i>S. aureus</i>	CP009361.1
<i>S. epidermidis</i>	AE015929.1
<i>S. hominis</i>	ACLP01000007.1
<i>E. faecalis</i>	CP008816.1

Si se quiere comparar los aminoácidos, primero se tienen traducir las bases nucleicas por los correspondientes aminoácidos, para esto se hace uso de la web EMBOSS Transeq ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)).

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este TFG se ha realizado el estudio y caracterización de los mecanismos de resistencia a linezolid y a otros antibióticos en 18 cepas clínicas de *Staphylococcus* spp (n=15) y de *Enterococcus* spp (n=3) resistentes a linezolid (LZD<sup>R</sup>), procedentes de dos hospitales (HSP y HAV) de dos Comunidades Autónomas (La Rioja y Cataluña). Para facilitar el análisis y la discusión de los resultados, se tratarán las distintas especies bacterianas por separado.

Como disponíamos de los datos de sensibilidad a antibióticos de estas cepas (aportados por los centros de origen), excepto para el cloranfenicol, se procedió a estudiar la sensibilidad a este fármaco por el sistema de difusión en disco. Una vez realizados los antibiogramas y medidos los diámetros de los halos de inhibición en las 18 cepas, evidenciamos que todas estas cepas eran resistentes al cloranfenicol. El estudio de la resistencia a este antibiótico es importante, ya que los mecanismos de resistencia al mismo se asocian a la expresión de los genes *cfr*, *optrA*, *poxA* y *cfrB* que también confieren resistencia al linezolid.

### 4.1 Estudio en *Staphylococcus* spp

En la Tabla 7 se puede ver el fenotipo de resistencia a antibióticos de las 15 cepas de *Staphylococcus* spp. Todas estas cepas mostraron resistencia a penicilina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, oxacilina, cefoxitina, ciprofloxacino, levofloxacino, gentamicina, tobramicina, eritromicina, clindamicina, cloranfenicol, y linezolid (exceptuando la cepa X2220 que no ha sido testada para ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, o ciprofloxacino). Asimismo, la mayor parte de las cepas fueron resistentes a trimetoprim-sulfametoxazol (excepción: X2312 es sensible). En la Tabla 6 se puede observar asimismo la existencia de cepas resistentes a otros antibióticos testados.

Conocido el fenotipo de resistencia a antibióticos, estudiamos su genotipo de resistencia, para determinar que genes estaban involucrados en la resistencia a un determinado antibiótico. Para ello realizamos reacciones PCR para los genes relacionados con la resistencia a antibióticos beta-lactámicos (*mecA* y *blaZ*), linezolid (*cfr*, *cfrB*, *optrA* y *poxA*), macrólidos-lincomicinas-estreptograminas (*ermA*, *ermB*, y *ermC*) y aminoglucósidos (*ant(4')*-la).

En todas las cepas de *Staphylococcus* spp se pudo detectar por PCR la presencia de los genes *blaZ* (codificante de una beta-lactamasa) y *mecA* (codificante de la proteína de unión a la penicilina PBP2a), mecanismos responsables de la resistencia a los antibióticos betalactámicos.

De las 14 cepas con fenotipo de resistencia eritromicina-clindamicina, se detectó el gen *ermC* en 4 de ellas (aunque en dos de estas cepas se requiere su confirmación futura ya que el resultado de PCR salió dudoso); sin embargo, todas las cepas fueron negativas para los genes *ermA* y *ermB*. En un futuro se analizarán otros mecanismos de resistencia a macrólidos, como es el gen *msrA* (codificante de una bomba de eflujo que expulsa macrólidos) que pudiera estar presente en las cepas *ermB*-negativas, o también otros genes *erm* no estudiados.

Las 15 cepas de *Staphylococcus* spp presentaron resistencia a tobramicina y en todas ellas se detectó el gen *ant(4')*-la, codificante de una enzima nucleotidiltransferasa modificante de la tobramicina (una de las cepas presentó un resultado dudoso que será verificado).

En la Tabla 7 se puede observar la CMI a linezolid de las 15 cepas de *Staphylococcus* y los resultados de los mecanismos de resistencia a este antibiótico que han sido analizados.

En este sentido, se estudió la presencia 4 genes que confieren resistencia al linezolid (*cfr*, *cfrB*, *optrA* y *poxA*) y que suelen estar incluidos en elementos genéticos móviles. Resulta de interés la detección del gen *cfr* en dos de las 15 cepas de *Staphylococcus* estudiadas (*S. aureus* X1846 y *S. epidermidis* X2222, ambas del HSP), lo que supone un 13,3% de esta colección. En la realización de las técnicas de PCR se incluyó en todos los casos controles positivos y negativos. Las muestras serán positivas, es decir, contendrán el gen que estamos estudiando cuando se detecta una banda de ADN del mismo tamaño que el control positivo, no existiendo bandas de amplificación de ADN en el control negativo (ver Figura 24). Este gen codifica una metiltransferasa del ARNr 23S y confiere un fenotipo de multirresistencia; se ha detectado previamente en cepas de *Staphylococcus* de diferentes especies y orígenes. (Lozano et al., 2012, Schwarz et al., 2018, Ruiz-Ripa et al., 2020a)

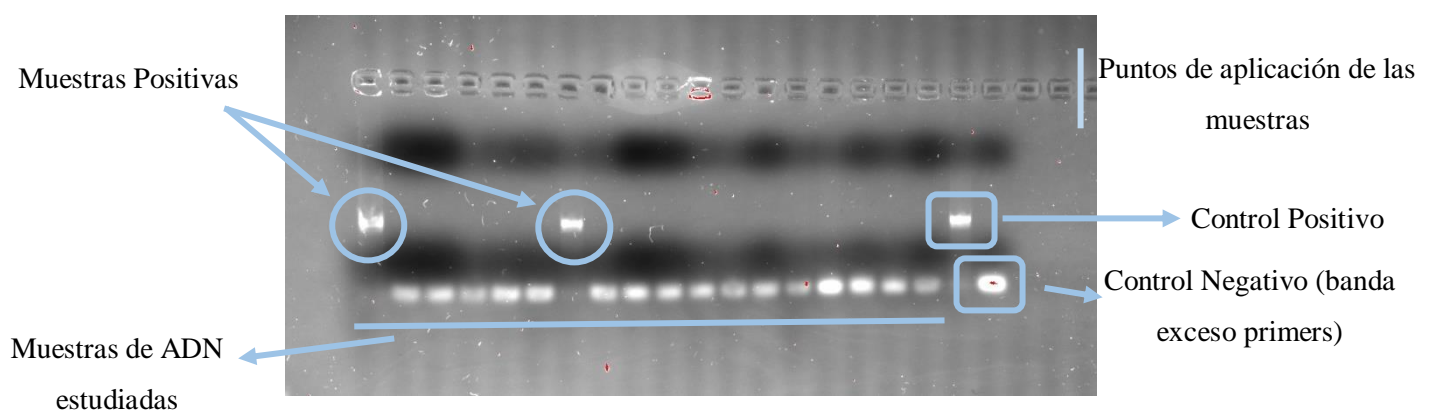


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa del gen *cfr* (Elaboración propia)

El gen *optrA*, así como los genes *poxA* y *cfrB* no fueron detectados en ninguna de las cepas de *Staphylococcus* analizadas.

Tabla 7. Fenotipo y genotipo de resistencia de 15 cepas del género *Staphylococcus* incluidas en este estudio.

CEPA	ESPECIE	FENOTIPO RESISTENCIA <sup>2</sup>	GENOTIPO DE RESISTENCIA
X1846	<i>S. aureus</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, CIP, LEV, GEN, TOB, CLI, LZD, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la, cfr</i>
X2220	<i>S. epidermidis</i>	PEN, OXA, FOX, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, RIF, SXT, FOS, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la</i>
X2221	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, Q/D, LZD, SXT, PRI, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la</i>
X2222	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, Q/D, TEC, LZD, SXT, PRI, CHL	<i>mecA, blaZ, ermC, ant(4')-la, cfr</i>
X2223	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, TET <sup>(1)</sup> , LZD, SXT, MUP, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la</i>
X2224	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT, MUP, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la</i>
X2085	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT <sup>(1)</sup> , FOS, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la</i>
X2307	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT <sup>(1)</sup> , FOS, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la</i>
X2308	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT <sup>(1)</sup> , FOS, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la</i>
X2309	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT <sup>(1)</sup> , MUP, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la</i>
X2310	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT <sup>(1)</sup> , MUP, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la</i>
X2311	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, TET <sup>(1)</sup> , LZD, SXT, FOS, CHL	<i>mecA, blaZ, ant(4')-la*</i>
X2313	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, SXT, FOS, CHL	<i>mecA, blaZ, ermC*, ant(4')-la</i>
X2314	<i>S. epidermidis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, Q/D, LZD, SXT, PRIS, CHL	<i>mecA, blaZ, ermC*, ant(4')-la</i>
X2312	<i>S. hominis</i>	PEN, AMC, AMP, OXA, FOX, CIP, LEV, GEN, TOB, ERI, CLI, LZD, MUP, CHL	<i>mecA, blaZ, ermC, ant(4')-la</i>

\*No queda claro la presencia del gen en la cepa. Pendiente de verificación.

Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a linezonid y mecanismos de resistencia implicados de las 15 cepas del género *Staphylococcus* incluidas en este estudio.

CEPA	ESPECIE	CMI LZD (µg/mL)	Genes de resistencia				MUTACIONES			
			<i>cfr</i>	<i>cfrB</i>	<i>optrA</i>	<i>poxtA</i>	23S	L3	L4	L22
X1846	<i>S. aureus</i>	>4	+	-	-	-	NM	NM	*	NM
X2220	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	L101V, Q136L, M156T	G69R, in-71Gly72	NM
X2221	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	C2561T**	L101V, A157R	N158S	NM
X2222	<i>S. epidermidis</i>	>256	+	-	-	-	C2561T **	NM	N158S	NM
X2223	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	L101V, Q136L, M156T	G69R, in-71Gly72	NM
X2224	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	L101V, Q136L, M156T	G69R, in-71Gly72	NM
X2085	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	L101V, Q136L, M156T	in-71Gly72	NM
X2307	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	L101V, Q136L, M156T	in-71Gly72	*
X2308	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	L101V, Q136L, M156T	in-71Gly72	*
X2309	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	L101V, Q136L, M156T	G69R, in-71Gly72	*
X2310	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	***	G69R, in-71Gly72	*
X2311	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	L101V, Q136L, M156T	in-71Gly72	*
X2313	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	L101V, Q136L, M156T	in-71Gly72	*
X2314	<i>S. epidermidis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	L101V, Q136L, M156T	G69R, in-71Gly72	*
X2312	<i>S. hominis</i>	>256	-	-	-	-	G2603T	NM	*	*

\* No realizado

\*\* Solo 2 de las copias del gen presentaban esta mutación

\*\*\* No se pueden extraer datos fiables de este cromatograma, se repetirá la secuenciación.

NM: Sin mutaciones

Una vez estudiados los genes de resistencia a linezolid, quisimos saber si las cepas de *Staphylococcus* LZD<sup>R</sup> podrían tener otros mecanismos de resistencia por modificación de las dianas de acción del antibiótico. Por ello se estudiaron las mutaciones en los genes codificantes del ARNr 23S y de las proteínas ribosomales L3, L4 y L22.

Doce de las 15 cepas de *Staphylococcus* (todas ellas *S. epidermidis* o *S. hominis*) presentaron la mutación **G2603T** (G2576T según la nomenclatura de *Escherichia coli*) en el gen del ARNr 23S, que se asocia a altos niveles de resistencia a linezolid (Long & Vester, 2012), como se observa en todas nuestras cepas que presentaron una elevada CMI a LZD (>256 µg/mL). En la Figura 25 se presenta la secuencia del gen del ARNr 23S de la cepa X2220, donde se evidencia la mutación citada.



Figura 25. Mutaciones en ARNr 23S de la cepa X2220 (Elaboración propia)

Además de esta mutación, en 2 cepas de *S. epidermidis* (X2221 y X2222) se ha detectado la mutación **C2561T** (C2534T en *Escherichia coli*). En este caso, se observó en el cromatograma la existencia de dos picos (ver Figura 26), es decir, que no todas las copias del gen estaban alteradas, solo 2 de las 4 alelos estaba modificado. Es frecuente que esta mutación no aparezca en todas las copias genéticas, sino que aparezca en algunas de ellas. (Lozano Fernández, 2012). Por otro lado, la cepa de SARM portadora del gen *cfr* no presentó mutaciones en el gen del ARNr 23S.

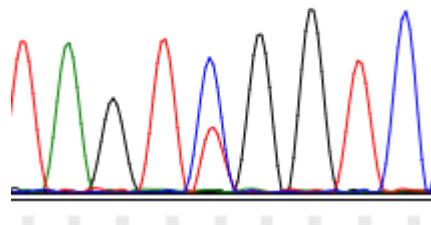


Figura 26. Cromatograma de la cepa X2221 (Elaboración propia).

Para estudiar los cambios aminoacídicos en las proteínas ribosomales en las cepas analizadas, realizamos el alineamiento de los aminoácidos de una secuencia de referencia sin mutaciones obtenida de GenBank con nuestras secuencias de aminoácidos.



En la proteína L3 (codificada por el gen *rplC*), se observaron cambios aminoacídicos en la mayoría de las cepas de *S. epidermidis* (Tabla 8). En cambio, en la cepa de *S. aureus* y de *S. hominis* analizadas no se detectan modificaciones en esta proteína. El cambio aminoacídico **L101V** (Leu101Val) se identifica en 11 de las 13 cepas de *S. epidermidis*, pero esta modificación no está relacionada con la resistencia al linezolid según algunos autores (López-Fabal et al., 2013). La mutación **Q136L** (Cln136Leu) también ha sido detectada en 10 de las 13 cepas de *S. epidermidis*, siempre acompañada del cambio **M156T** (Met156Thr), como ya se ha detectado en experimentos previos (Pfalter et al., 2017). En la cepa X2221 hemos detectado el cambio aminoacídico **A157R** (Ala157Arg), frecuentemente implicado en la resistencia a linezolid.

El gen *rplD* codifica la proteína ribosomal L4, y hemos estudiado las mutaciones que se producen en dicho gen, así como los cambios aminoacídicos derivados de las mismas como mecanismo de resistencia a linezolid. Se producen tanto sustituciones aminoacídicas como inserciones. En un 73,3% de las cepas de estafilococos analizadas hemos detectado la inserción **in-71Gly72** (inserción de una glicina en la posición 71). Esta inserción aminoacídica está presente en 11 de las 15 cepas, todas ellas de la especie *S. epidermidis*. Acompañando a la inserción hemos detectado el cambio **G69R** (Gly69Arg) en el 40% de los casos. En dos de las cepas de *S. epidermidis* (X2221 y X2222) hemos encontrado la sustitución **N158S** (Asn158Ser), pero este cambio no interfiere en la resistencia al linezolid, sino que se piensa que puede ser un marcador clonal más que un mecanismo de resistencia (Dortet et al., 2017). En la Figura 31 se muestra un ejemplo representativo de los cambios de aminoácidos en la cepa X2314.

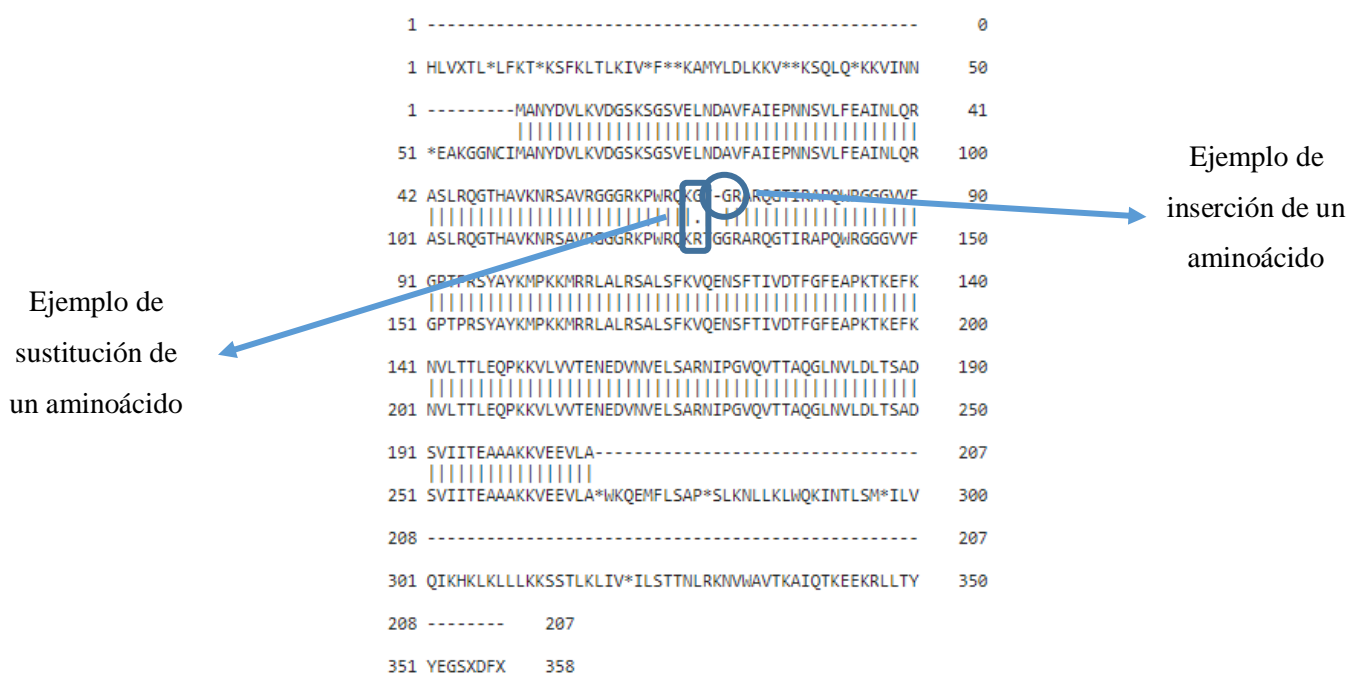


Figura 27. Mutaciones en la proteína L4 de la cepa X2314 (Elaboración propia)

Por último, se ha realizado el estudio de las mutaciones en el gen *rplV* (codificante de la proteína ribosomal L22) en 6 cepas de *S. epidermidis* y en la cepa de *S. aureus*, identificándose la secuencia salvaje (wild-type, sin mutaciones) en todos los casos.

#### 4.2 Estudio de las cepas de *Enterococcus*

En la Tabla 9 se presenta el fenotipo y genotipo de resistencia a antibióticos de las 3 cepas de *Enterococcus* spp LZD<sup>R</sup> estudiadas. Todas ellas son resistentes además de al LZD, a gentamicina (resistencia de alto nivel) y a cloranfenicol. Como se puede observar en la tabla, estas cepas presentaron resistencia variable a otros antibióticos (levofloxacino, ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol, amikacina, tobramicina, eritromicina y estreptomicina).

En función del fenotipo de resistencia detectado, se analizó por PCR la presencia de distintos genes de resistencia. El genotipo de resistencia (Tabla 9) que hemos analizado muestra como en las 3 cepas está presente el gen *ermB*, además en la cepa X2219 hemos detectado el gen *ermA*. En ninguna de las cepas hemos sido capaces de detectar el *ermC*.

Es importante señalar que las 3 cepas de enterococos analizadas contenían el gen de resistencia a linezolid *optrA* (Figura 28). Este gen fue descrito por primera vez en *Enterococcus* en China en el año 2015 (Wang et al., 2015), y después de esta primera descripción, se ha detectado esporádicamente en otros países, tanto entre cepas humanas, como de animales o ambientales (Torres et al., 2018; Ruiz-Ripa et al., 2020c), muy especialmente asociado a la especie *E. faecalis*, como es nuestro caso. Ninguna de estas cepas portaba los *cfrB* y *poxA*.

Nos propusimos estudiar las mutaciones en los genes de las proteínas ribosomales al igual que se hizo con las cepas de *Staphylococcus*, sin embargo, solamente se pudo analizar las mutaciones en el gen de la proteína L3 en la cepa de *E. faecalis* (X1762), sin detectar ninguna mutación en la secuencia. El resto no pudo realizarse por iniciarse el periodo de alarma por la pandemia del coronavirus.

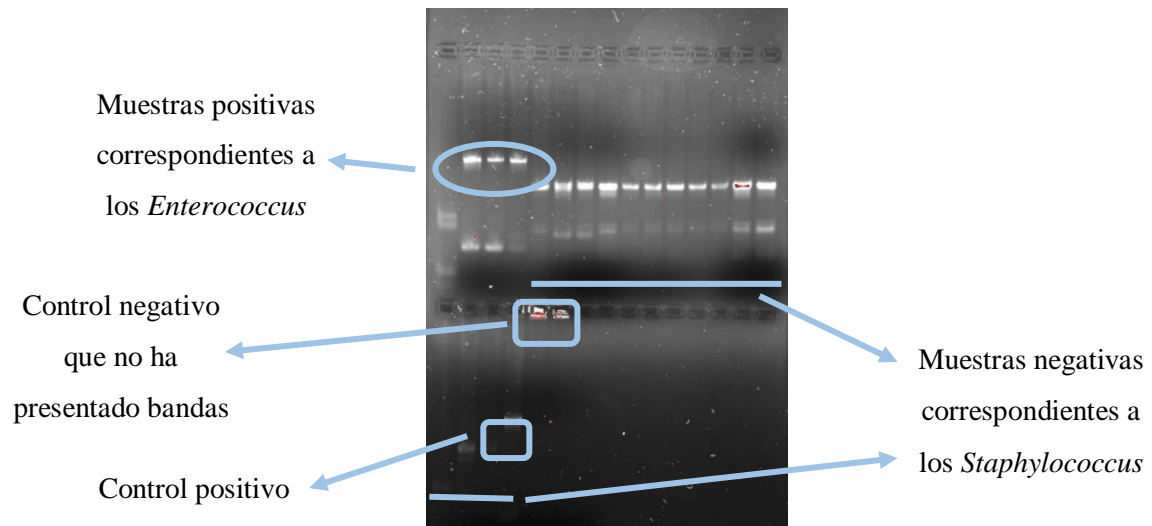


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa del gen *optrA* (Elaboración propia)

Tabla 9. Fenotipo y genotipo de resistencia de las 3 cepas del género *Enterococcus* incluidas en este estudio.

CEPA	ESPECIE	FENOTIPO RESISTENCIA <sup>2</sup>	GENOTIPO DE RESISTENCIA
<b>X1762</b>	<i>E. faecalis</i>	OXA, GEN, AMK, TOB, GEN, LEV, ERI, CLI, SXT, LZD, CHL	<i>ermB, optrA</i>
<b>X1763</b>	<i>E. faecalis</i>	GEN, LZD, CHL	<i>ermB, optrA</i>
<b>X2219</b>	<i>E. faecalis</i>	CIP, LEV, STR, GEN, SXT, LZD, CHL	<i>ermA, ermB, optrA</i>

Tabla 10. CMI a linezolid y mecanismos de resistencia implicados de las 3 cepas del género *Enterococcus* incluidas en este estudio.

CEPA	ESPECIE	CMI LZD (µg/mL)	Genes de resistencia				MUTACIONES			
			<i>cfr</i>	<i>cfrB</i>	<i>optrA</i>	<i>poxtA</i>	23S	L3	L4	L22
<b>X1762</b>	<i>E. faecalis</i>	32	-	-	+	-	NM	NM	*	*
<b>X1763</b>	<i>E. faecalis</i>	12	-	-	+	-	*	*	*	*
<b>X2219</b>	<i>E. faecalis</i>	>8	-	-	+	-	*	*	*	*

\* No realizado

NM: Sin mutaciones

## 5 CONTINUACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Debido a la situación excepcional de este curso no se ha podido completar la investigación que se estaba realizando para este TFG.

En circunstancias normales los siguientes pasos del estudio de resistencia a antibióticos de las 18 cepas clínicas de *Staphylococcus* y *Enterococcus* hubieran sido los siguientes:

- Completar el genotipo de resistencia con el estudio de genes adicionales como *msrA*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *tet*, *fus*, *dfr*, *fexA*, *fexB*, *vga*, y *lsa*
- Tipado molecular por multilocus-sequence-typing (MLST) de las cepas portadoras de los genes *optrA* y *cfr*, y por *spa*-typing a la cepa de *S. aureus*.
- Finalización del estudio de mutaciones en el ARNr 23S, L3 L4 y L22 en las cepas de *Enterococcus*.
- Estudio del entorno genético de *optrA* y *cfr* mediante reacciones de PCR y secuenciación.
- Verificación de algunos genes cuyos resultados han salido dudosos (indicados en el trabajo).

## 6 CONCLUSIONES

- 1) Todas las cepas LZD<sup>R</sup> son multirresistentes y contienen los genes *mecA*, *blaZ*, *ant(4')*-la
- 2) Todas las cepas *S. epidermidis* y *S. hominis* LZD<sup>R</sup> presentan mutaciones en gen del ARNr 23S, siendo G2603T la mutación más frecuente, detectada en la cepa *S. hominis* y en 11 de las 13 cepas *S. epidermidis* analizadas.
- 3) La proteína ribosomal L3 se encuentra mutada en 11 de las 12 cepas *S. epidermidis* analizadas. El cambio aminoacídico Q136L acompañado de M156T, implicado en la resistencia a linezolid, está presente en 10 de ellas y en la restante se detecta A157R.
- 4) Se ha detectado la inserción in-71Gly72 en la proteína L4, en 11 de las 15 cepas de *Staphylococcus*, acompañada en 6 casos del cambio G69R.
- 5) Se ha identificado el gen de resistencia a linezolid *cfr*, que se relaciona con un fenotipo de multirresistencia, en la cepa SARM y en la cepa *S. epidermidis* sin la mutación G2603T en ARNr 23S y con la proteína L3 no mutada.
- 6) Las 3 cepas de *E. faecalis* LZD<sup>R</sup> estudiadas en este trabajo albergan el gen emergente de resistencia a linezolid *optrA*, descrito por primera vez en 2015.

La resistencia a LZD en *Staphylococcus* y *Enterococcus* es un problema emergente en el ámbito clínico y aunque los mecanismos más frecuentes son mutaciones o cambios aminoacídicos en las dianas del antibiótico (sin capacidad de transferencia horizontal), están emergiendo cepas portadoras de genes de resistencia de posible localización plasmídica. En todas las cepas LZD<sup>R</sup> analizadas en este estudio se han detectado o bien cambios en las dianas de acción de linezolid, o bien la presencia de los genes *cfr* u *optrA*, cuya diseminación debe ser vigilada ya que implica una mayor problemática epidemiológica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Antonelli, A., D'Andrea, M., Brenciani, A., Galeotti, C., Morroni, G., Pollini, S., . . . Rossolini, G. (2018). Characterization of *poxA*, a novel phenicol–oxazolidinone–tetracycline resistance gene from an MRSA of clinical origin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 73(7), 1763-1769.
- Baos, E., Candel, F.J., Merino, P., Pena, I., & Picazo, J.J. (2013). Characterization and monitoring of linezolid-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* in an intensive care unit 4 years after an outbreak of infection by *cfr*-mediated linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76, 325-329.
- Bender, J., Strommenger, B., Steglich, M., Zimmermann, O., Fenner, I., Lensing, C., Dagwadordsch, U., Kekulé, A.S., Werner, G., & Layer, F. (2015). Linezolid resistance in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* from German hospitals and characterization of two *cfr*-carrying plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.*, 70, 1630-1638.
- Benito Pascual, D. (2015). Líneas genéticas, virulencia y resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes. Análisis de marcadores de adaptación al huésped y comportamiento en *Caenorhabditis elegans* (Tesis Doctoral). Universidad de La Rioja, Logroño, España.
- Bi, R., Qin, T., Fan, W., Ma, P., & Gu, B. The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 13, 11-19.
- Bonilla, H., Huband, M., Seidel, J., Schmidt, H., Lescoe, M., McCurdy, S., . . . Quinn, J. (2010). Multicity outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with clonal spread of a *cfr*-containing strain. *Clin. Infect. Dis.*, 51(7), 796-800.
- Bosling, J., Poulsen, S., Vester, B., & Long, K. (2003). Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein L3. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47(9), 2892-2896.
- Cámara, J., Camoez, M., Tubau, F., Pujol, M., Ayats, J., Ardanuy, C., & Domínguez, M.Á. (2019). Detection of the novel *optrA* gene among linezolid-resistant enterococci in Barcelona, Spain. *Microb. Drug Resist.*, 25, 87-93.
- Cercenado E, Marín M, Insa R, Bouza E. (2010). Emerging linezolid resistance: dissemination of the *cfr* gene among *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* and inability of the Etest method for detection, abstr C2-1490. *Abstr. 50th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother.*, Boston, MA.

- Cui, L., Wang, Y., Lv, Y., Wang, S., Song, Y., Li, Y., Liu, J., Xue, F., Yang, W., & Zhang, J. (2016). Nationwide surveillance of novel oxazolidinone resistance gene *optrA* in *Enterococcus* isolates in China from 2004 to 2014. *Antimicrob. Agents Chemother*, 60, 7490-7493.
- Deshpande, L., Ashcraft, D., Kahn, H., Pankey, G., Jones, R., Farrel, D., & Mendes, R. (2015). Detection of a new *cfr*-like gene, *cfrB*, in *Enterococcus faecium* isolates recovered from human specimens in the United States as part of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother*, 59, 6256-6261.
- Deshpande, L.M., Castanheira, M., Flamm, R.K., & Mendes, R.E. (2018). Evolving oxazolidinone resistance mechanisms in a worldwide collection of enterococcal clinical isolates: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J. Antimicrob. Chemother*, 73, 2314-2322.
- Diaz, L., Kiratisin, P., Mendes, R., Panesso, D., Singh, K., & Arias, C. (2012). Transferable plasmid-mediated resistance to linezolid due to *cfr* in a human clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 56, 3917-3922.
- Dibo, I., Pillai, S., Gold, H., Baer, M., Wetzler, M., Slack, J., . . . al., e. (2004). Linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from a cord blood transplant recipient. *J. Clin. Microbiol*, 42, 1843-1845.
- Dortet, L., Philippe, G., Kassis-Chikhani, N., Ichai, P., Boudon, M., Didier, S., . . . Naas, T. (2017). Long-lasting successful dissemination of resistance to oxazolidinones in MDR *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates in a tertiary care hospital in France. *J. Antimicrob. Chemother*, 73.
- Europea Centre for Disease Prevention and Control (2018). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017*. Stockholm: ECDC
- Foster, T. (2009). Colonization and infection of the human host by *staphylococci*: adhesion, survival and immune evasion. *Vet. Dermatol*, 20(5-6), 456-70.
- Frickmann, H., Hahn, A., & Skusa, R. (2018). Comparison of the etiological relevance of *Staphylococcus hominis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 37, 1539-1545.
- Gilmore, M., Clewell, D., Ike, Y., & Shankar, N. (2014). *Enterococci*; From commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.



- Gonzales, R.D., Schreckenberger, P.C., Graham, M.B., Kelkar, S., DenBesten, K., & Quinn, J.P. (2001). Infections due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet*, 357, 1179.
- Gu, B., Kelesidis, T., Tsiodras, S., Hindler, J., & Humphries, R. M. (2013). The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J. Antimicrob. Chemother*, 68, 4-11.
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009). Envolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol*, 11, 1034-43.
- Hashemian, S., Farhadi, T., & Ganjparvar, M. (2018). Linezolid: a review of its properties, function, and use in critical care. *Drug design, development and therapy*, 12, 1759-1767.
- Hayes, V., Curtis, M., Wyke, A., & Ward, J. (1981). Decreased affinity of penicillin binding protein for  $\beta$ -lactam antibiotics in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. *FEMS Microbiol Lett*, 10, 119-122.
- Ikonomidis, A., Grapsa, A., Pavlioglou, C., Demiri, A., Batarli, A., & Panapoulou, M. (2016). Accumulation of multiple mutations in linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* causing bloodstream infections; in silico analysis of L3 amino acid substitutions that might confer high-level linezolid resistance. *J. Chemother*, 28(6), 465-468.
- Kehrenberg, C., & Schwarz, S. (2006). Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother*, 50, 1156-1163.
- Klare, I., Konstabel, C., Mueller-Bertling, S., Werner, G., Strommenger, B., Kettlitz, C., . . . Witte, W. (2005). Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 24, 815-825.
- Kuroda, M., Sekizuka, T., Matsui, H., Suzuki, K., Seki, H., Saito, M., & Hanaki, H. (2018). Complete genome sequence and characterization of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate KUB3006 carrying a *cfrB*-transposon on its chromosome and *optrA*-plasmid. *Front. Microbiol*, 9, 2576.
- Lee, S.-M., Huh, H., Song, D., Shim, H., Park, K., Kang, C.-I., . . . Lee, N. (2017). Resistance mechanisms of linezolid-nonsusceptible *enterococci*. *J. Med Microbiol*, 66, 1730-1735.
- Li, D., Wang, Y., Schwarz, S., Cai, J., Fan, R., Li, J., Feßler, A.T., Zhang, R., Wu, C., & Shen, J. (2016). Co-location of the oxazolidinone resistance genes *optrA* and *cfr* on a

- multiresistance plasmid from *Staphylococcus sciuri*. *J. Antimicrob. Chemother*, 71(6), 1474-1478.
- Liu Y, Wang Y, Wu C, et al. (2012). First report of the multidrug resistance gene *cfr* in *Enterococcus faecalis* of animal origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(3), 1650-1654.
- Livermore, D. (2003). Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51(2), 9-16.
- Locke, J., Hilgers, M., & Shaw, K. (2009). Novel ribosomal mutations in *Staphylococcus aureus* strains identified through selection with the oxazolidinones linezolid and terezolid (TR-700). *Antimicrob. Agents Chemother*, 53(12), 5265-5274.
- Long, K., & Vester, B. (2012). Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 603-612.
- López, M., Kadlee, K., Schwarz, S., & Torres, C. (2012). First detection of the *staphylococcal* trimethoprim resistance gene *dfrK* and the *dfrK*-carrying transposon Tn559 in *enterococci*. *Microb. Drug Resist*, 18, 13-18.
- López, M., Tenorio, C., del Campo, R., Zarazaga, M., & Torres, C. (2011). Characterization of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in vancomycin-resistant *enterococci* of different origins. *J. Chemother*, 23, 87-91.
- López-Fabal, F., Román Alonso, F., Almagro Moltó, M., Sanz Rodríguez, N., & Gómez-Garcés, J. (2013). *Staphylococcus coagulasa* negativos resistentes al linezolid: características fenotípicas, genotípicas y sensibilidad a combinaciones de antibióticos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(7), 442-447.
- Lozano Fernández, C. (2012). *Epidemiología molecular de Staphylococcus aureus resistente a meticilina del linaje CC398 de distintos orígenes: resistencia, virulencia y contenido plasmídico* (Tesis doctoral). Universidad de La Rioja, Logroño.
- Lozano, C., Aspiroz, C., Ara, M., Gómez-Sanz, E., Zarazaga, M., & Torres, C. (2011). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in a farmer with skin lesions and in pigs of his farm: clonal relationship and detection of *lnu(A)* gene. *Clin Microbiol Infect*, 17(6), 923-927.
- Lozano, C., Aspiroz, C., Gómez-Sanz, E., Tirado, G., Fortuño, B., Zarazaga, M., & Torres, C. (2013). Characterization of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *S. haemolyticus* strains in a Spanish hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31(3), 136-41.

- Lozano, C., Ruiz-García, M., Gómez-Sanz, E., López-García, P., Royo-García, G., Zarazaga, M., & Torres, C. (2012). Characterization of a *cfr*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain of the lineage ST22 implicated in a life-threatening human infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73(4), 380–382.
- MacCallum, W., & Hastings, T. (1899). A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (Nov. Spec.), with a description of the microorganism. *J. Exp Med*, 4(5-6), 521-534.
- Mendes, R., Deshpande, L., Farrel, D., Spanu, T., Fadda, G., & Jones, R. (2010). Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. *J. Antimicrob. Chemother*, 65(11), 2329-2335.
- Mendes, R.E., Deshpande, L.M., Castanheira, M., DiPersio, J., Saubolle, M.A., & Jones, R.N. (2008). First report of *cfr*-mediated resistance to linezolid in human staphylococcal clinical isolates recovered in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2244-2246.
- Mendes, R., Deshpande, L., & Jones, R.N. (2014). Linezolid update: stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resist. Updat*, 17, 1-12.
- Mendes, R., Deshpande, L., Streit, J.M., Sader, H.S., Castanheira, M., Hogan, P.A., & Flamm, R.K. (2018). ZAAPS programme results for 2016: An activity and spectrum analysis of linezolid using clinical isolates from medical centres in 42 countries. *J. Antimicrob. Chemother*, 73, 1880-1887.
- Menezes Pereira, E., Simoes de Mattos, C., Cabral dos Santos, O., Carvalho Ferreira, D., Lopes Rocha de Oliveira, T., & Sliva Laport, M. (2019). *Staphylococcus hominis* subspecies can be identified by SDS-PAGE or MALDI-TOF MS profiles. *Sci Rep*, 9, 11736.
- Miller, K., Dunsmore, C., & Fishwick, C. (2008). Linezolid and tiamulin cross-resistance in *Staphylococcus aureus* mediated by point mutations in the peptidyl transferase center. *Antimicrob. Agents Chemother*, 52, 1747-1742.
- Morales, J., Picazo, J., Baos, E., Candel, F.J., Arribi, A., Peláez, B., Andrade, R., de la Torre, M.A., Fereres, J., Sánchez-García, M. Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first report of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 821–825.
- Moure, Z., Lara, N., Marín, M., Sola-Campoy, P.J., Bautista, V., Gómez-Bertomeu, F., Gómez-Dominguez, C., Pérez-Vázquez, M., Aracil, B., Campos, J., et al. Interregional spread in

- Spain of linezolid-resistant *Enterococcus spp.* isolates carrying the *optrA* and *poxA* genes. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21, 1059-77.
- Mulvey, M., & Simor, A. (2009). Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *CMAJ*, 180, 408-415.
- Musumeci, R., Calaresu E., Gerosa, Oggioni, J.D., Bramati, S., Morelli, P., Mura, I., Piana, A., Are, B.M., & Cocuzza, C.E. (2016). Resistance to linezolid in *Staphylococcus spp.* clinical isolates associated with ribosomal binding site modifications: novel mutation in domain V of 23S rRNA. *New Microbiol*, 39, 269-273.
- Nester, E., Anderson, D., Evans Roberts, C., Pearsall, N., & Nester, M. (2001). *Microbiology: A human perspective* (3rd ed.). New York: McGraw Hill.
- Otto, M. (2014). *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 1106, 17-31.
- Papagiannitsis, C.C., Tsilipounidaki, K., Malli, E., & Petinaki, E. (2019). Detection in Greece of a clinical *Enterococcus faecium* isolate carrying the novel oxazolidinone resistance gene *poxA*. *J. Antimicrob. Chemother*, 74, 2461-2462.
- Pfaller, M. A., Mendes, R., Streit, J., Hogan, P., & Flamm, R. (2017). Five-year summary of in vitro activity and resistance mechanisms of linezolid against clinically important Gram-Positive cocci in the United States from the LEADER Surveillance Program (2011 to 2015). *Antimicrob. Agents. Chemother*, 61(7), 609-617.
- Portillo , A., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Alonso, A., Martínez, J., & Torres, C. (2000). Macrolide resistance genes in *Enterococcus spp.* *Antimicrob. Agents. Chemother*, 44, 967-971.
- Quiles-Melero, I., Gómez-Gil, R., Romero-Gómez, M., Sánchez-Díaz, A., de Pablos, M., García-Rodríguez, J., . . . Mingorance, J. (2013). Mechanisms of linezolid resistance among *Staphylococci* in a Tertiary Hospital. *J. Clin. Microbiol*, 51(3), 998-1001.
- Rodríguez-Lucas, C., Rodicio, M.R., Càmara, J., Domínguez, D.A., Alaguero, M., & Fernández, J. (2019). Long-term endemic situation caused by a linezolid- and methicillin-resistant clone of *Staphylococcus epidermidis* in a tertiary hospital. *J. Hosp. Infect*, 105(1), 64-69.
- Rouard, C., Aslangul, E., & Rivière, A. (2017). Mutation in the L3 ribosomal protein could be associated with risk of selection of high-level linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* strains. *Microb Drug Resist*, 23(4), 462-467.

- Ruiz-Ripa, L., Bellés, A., García, M., & Torres, C. (2020a). Detection of a *cfr*-positive MRSA CC398 strain in a pig farmer in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, S0213-005X(20)30175-0.
- Ruiz-Ripa, L., Feßler, A. T., Hanke, D., Sanz, S., Olarte, C., Eichhorn, I., Schwarz, S., & Torres, C. (2020b). Detection of *poxA*- and *optrA*-carrying *E. faecium* isolates in air samples of a Spanish swine farm. *J. Glob Antimicrob Resist*, 22, 28–31.
- Ruiz-Ripa, L., Feßler, A.T., Hanke, D., Sanz, S., Olarte, C., Mama, O., . . . Torres, C. (2020c). Coagulase-negative *staphylococci* carrying *cfr* and PVL genes and MRSA/MSSA-CC398 in the swine farm environment. *Vet. Microbiol*, 243, 108631.
- Sadowy, E. (2018). Linezolid resistance genes and genetic elements enhancing their. *Plasmid*, 99, 89-98.
- Sánchez-Gómez, J.C., Fraile-Malmierca, F., Valverdé-Romero, E.D., Sánchez, M., García-Rodríguez, J.A. & García-Sánchez, J.E. (2006). Linezolid-resistant *Enterococcus faecalis*: first report in Spain. *J. Chemother*, 18, 440-442.
- Schnellmann, C. G. (2006). Presence of new *mecA* and *mph(C)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus spp.* isolated from the skin of horses before and after clinic admission. *J. Clin. Microbiol*, 44(12), 4444-4454.
- Schwarz, S., Feßler, A. T., Loncaric, I., Wu, C., Kadlec, K., Wang, Y., & Shen, J. (2018). Antimicrobial Resistance among Staphylococci of Animal Origin. *Microbiol Spectr*, 6(4).
- Schwarz, S., Werckenthin, C., & Kehrenberg, C. (2010). Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 44, 2530-2533.
- Seral, C., Sáenz, Y., Algarate, S., Duran, E., Luque P., Torres C., & Castillo, F.J. (2011). Nosocomial outbreak of methicillin- and linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with catheter-related infections in intensive care unit patients. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 354-358.
- Sharkey, L., Edwards, T., & O'Neill, A. (2016). ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *MBio*, 7, 1975.
- Shen, J., Wang, Y., & Schwarz, S. Presence and dissemination of the multiresistance gene *cfr* in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother*, 68, 1697-1706.

- Stefani, S., Bongiorno, D., Mongelli, G., & Campanile, F. (2010). Linezolid resistance in *Staphylococci*. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 3(7), 1988-2006.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., & Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob. Agents Chemother*, 40, 2562-2566.
- Toh, S.M., Xiong, L., Arias, C.A., Villegas, M.V., Lolans, K., Quinn, J. & Mankin, A.S. (2007). Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular Microbiology*, 64, 1506-1514.
- Torres, C., & Cercenado, E. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de cocos grampositivos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*, 28, 541-543.
- Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Del Campo, R., & Coque, T. M. (2018). Antimicrobial resistance in *Enterococcus spp.* of animal origin. *Microbiology spectrum*, 6(4).
- Tsiodras S, Gold H.S., Sakoulas G, Eliopoulos G.M., Wennersten C., Venkataraman L., Moellering R.C., & Ferraro M.J. (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 358(9277), 207-208.
- Tyson, G., Sabo, J., Hoffmann, M., Hsu, C., Mukherjee, S., & Hernandez, J. (2018). Novel linezolid resistance plasmids in *Enterococcus* from food animals in the USA. *J. Antimicrob. Chemother*, 73, 3254-3258.
- van Belkum, A., Melles, D., Nouwen, J., van Leeuwen, W., van Wamel, W., Vos, M., . . . Verbrugh, H. (2009). Coevolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*, 9, 32-47.
- van de Klundert, J., & Vliegthart, J. (1993). PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes In *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications*; Persing, D., Smith, T., Tenover, F., & White, T., ASM, Washington, USA.
- Wang, J., Lin, D.C., Guo, X.M., Wei, H.K., Liu, X.Q., Chen, X.J., et al. (2015). Distribution of the multidrug resistance gene *cfr* in *Staphylococcus* isolates from pigs, workers, and the environment of a hog market and a slaughterhouse in Guangzhou, China. *Foodborne Pathog Dis*, 12, 598–605.
- Wang, Y., Lv, Y., Cai, J., Schwarz, S., Cui, L., Hu, Z., . . . Shen, J. (2015). A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *J. Antimicrob. Chemother*, 70(8), 2182-2190.

- Witte, W., & Cuny, C. (2011). Emergence and spread of *cfr*-mediated multiresistance in staphylococci: an interdisciplinary challenge. *Future Microbiol*, 6(8), 925-931.
- Wong, A., Reddy, S., Smyth, D., Agüero-Rosenfeld, M., Sakoulas, G., & Robinson, D. (2010). Polyphyletic emergence of linezolid-resistant staphylococci in the United States. *Antimicrob. Agents. Chemother*, 54(2), 742-748.
- Zhang, Y., Dong, G., Li, J., Chen, L., Liu, H., Bi, W., Lu, H., & Zhou, T. (2018). A high incidence and coexistence of multiresistance genes *cfr* and *optrA* among linezolid-resistant enterococci isolated from a teaching hospital in Wenzhou, China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*, 37, 1441-1448.

## ANEXOS

Tabla 1. Valores de CMI para el estudio de *Staphylococcus*.

Antibiótico	CMI (µg/mL)			Referencia
	R	I	S	
Amikacina	>16	-	≤8	EUCAST
Ampicilina	-	-	-	
Ceftarolina	≥8	-	≤1	CLSI
Clindamicida	≥4	1-2	≤0,5	CLSI
Cloranfenicol	≥32	16	≤8	CLSI
Daptomicina	>1	-	≤1	EUCAST
Eritromicina	≥8	1-4	≤0,5	CLSI
Fosfomicin	>32	-	≤32	EUCAST
Gentamicina	≥16	8	≤4	CLSI
Levofloxacino	≥4	2	≤1	CLSI
Linezolid	≥8	-	≤4	CLSI
Mupirocina	-	-	-	
Oxacilina	≥4	-	≤2	CLSI ( <i>S. aureus</i> )
	≥0,5	-	≤0,25	CLSI ( <i>S.epidermidis</i> )
Penicilina	≥0,25	-	≤0,12	CLSI
Quinupristin/Dalfopristin	≥4	2	≤1	CLSI
Rifampicina	>0,5	-	≤0,06	EUCAST
Estreptomicina	-	-	-	
Trimetoprima-Sulfametoxazol	≥4/76	-	≤2/38	CLSI
Teicoplanina	≥32	16	≤8	CLSI
Tetraciclina	≥16	8	≤4	CLSI
Tigeciclina	>0,5	-	≤0,5	EUCAST
Tobramicina	>1	-	≤1	EUCAST
Vancomicina	≥16	4-8	≤2	CLSI ( <i>S.aureus</i> )
	≥32	8-16	≤4	CLSI ( <i>S.epidermidis</i> y <i>hominis</i> )



Tabla 11. Valores de CMI para el estudio de *Enterococcus*.

Antibiótico	CMI (µg/mL)			Referencia
	R	I	S	
Amikacina	>128	-	≤128	EUCAST
Ampicilina	≥16	-	≤8	CLSI
Ceftarolina	-	-	-	
Clindamicida	-	-	-	
Cloranfenicol	≥32	16	≤8	CLSI
Daptomicina	≥8	2-4	≤1	CLSI
Eritromicina	≥8	1-4	≤0,5	CLSI
Fosfomicin	≥256	128	≤64	CLSI
Gentamicina Alta Carga	>128	-	≤128	EUCAST
Levofloxacino	≥8	4	≤2	CLSI
Linezolid	≥8	4	≤2	CLSI
Mupirocina	-	-	-	
Oxacilina	-	-	-	
Penicilina	≥16	-	≤8	CLSI
Quinupristin/Dalfopristin	≥4	2	≤1	CLSI
Rifampicina	≥4	2	≤1	CLSI
Estreptomicina	>512	-	≤512	EUCAST
Trimetoprima-Sulfametoxazol	>32	-	≤32	EUCAST
Teicoplanina	≥32	16	≤8	CLSI
Tetraciclina	≥16	8	≤4	CLSI
Tigeciclina	>0,25	-	≤0,25	EUCAST
Tobramicina	>128	-	≤128	EUCAST
Vancomicina	≥32	8-16	≤4	CLSI